RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON PROTEINEN IN KULTIVIERTEN MÄUSEEMBRYONEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Jean Nowak
aus Berlin
1984

RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON PROTEINEN IN KULTIVIERTEN MÄUSEEMBRYONEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Jean Nowak
aus Berlin

Erster Referent: Professor Dr. Dr. J. Klose
Zweiter Referent: Professor Dr. G. Obe

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 27. 7. 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. Einleitung	1
2. Experimente, Ergebnisse, Diskussionen	4
2.1. Kulturbedingungen für Postimplantationsembryonen	4
2.1.1. Material und Methoden	4
2.1.1.1. Versuchstiere	4
2.1.1.2. Präparations- und Kulturmedium	4
2.1.1.3. Präparationsmethoden	6
2.1.1.4. Inkubationsmethoden	10
2.1.1.5. Beurteilung der Embryonen	12
2.1.1.6. Aufarbeitung der Embryonen	15
2.1.1.7. Proteinbestimmung	17
2.1.2. Ergebnisse	18
2.1.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation	19
2.1.2.2. Proteinbestimmung in Abhängigkeit vom Alter der Embryonen	19
2.1.2.3. Vergleich der Inkubationsmethoden "Rotor" und "Schüttelwasserbad"	22
2.1.3. Diskussion	22
2.1.4. Schlußfolgerungen	27
2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen bei unterschiedlichen Präparationsbedingungen	28
2.2.1. Material und Methoden	28
2.2.1.1. Versuchstiere	28
2.2.1.2. Präparations- und Kulturmedium	28
2.2.1.3. Präparationsmethoden	28
2.2.1.4. Inkubationsmethode	29
2.2.1.5. Beurteilung und Aufarbeitung der Embryonen	29
2.2.1.6. Proteinbestimmung	30
2.2.1.7. Radioaktivitätsbestimmung	30
2.2.1.8. Auswertung der eingebauten Radioaktivität	31

Seite

2.2.2. Ergebnisse 31

2.2.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 31

2.2.2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Gesamt-Embryonen 34

2.2.2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryo-Teilen 39

2.2.3. Diskussion 46

2.2.4. Schlußfolgerungen 52

2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen in Abhängigkeit von der Konzentration des Isotops und der Inkubationsdauer 53

2.3.1. Material und Methoden 53

2.3.1.1. Versuchstiere 53

2.3.1.2. Präparations- und Kulturmedium 53

2.3.1.3. Präparationsmethode 54

2.3.1.4. Inkubationsmethode 54

2.3.1.5. Auswertungsmethode 55

2.3.2. Ergebnisse 55

2.3.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 56

2.3.2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (A) 59

2.3.2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen in Abhängigkeit von der ^{3}H-Aminosäure-Konzentration (B) 66

2.3.2.4. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen bei hoher ^{3}H-Aminosäurekonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (C) 70

2.3.3. Diskussion 74

2.3.4. Schlußfolgerungen 78

2.4. Einfluß der radioaktiven Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die Chromosomen der kultivierten Mäuseembryonen 80

2.4.1. Material und Methoden 80

2.4.1.1. Versuchstiere 80

2.4.1.2. Präparations- und Kulturmedium 81

2.4.1.3. Präparationsmethode 81

2.4.1.4. Inkubationsmethode 81

2.4.1.5. Beurteilung der Embryonen 81

Seite

2.4.1.6. Chromosomenuntersuchung von Mäuseembryonen 82
2.4.1.6.1. Anreicherung von Mitosen mit Metaphasechromosomen 82
2.4.1.6.2. Aufarbeitung der kultivierten Mäuseembryonen zur Chromosomendarstellung 82
2.4.1.6.3. Färbung der Maus-Präparate 83
2.4.1.6.4. Auswertung der Metaphasechromosomen 83
2.4.2. Ergebnisse 84
2.4.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 84
2.4.2.2. Analyse der Metaphasechromosomen der kultivierten Mäuseembryonen 86
2.4.3. Diskussion 88
2.4.4. Schlußfolgerungen 89
2.5. Einfluß der radioaktiv markierten Aminosäuren auf den morphologischen Zustand von kultivierten Mäuseembryonen 90
2.5.1. Material und Methoden 90
2.5.1.1. Versuchstiere 90
2.5.1.2. Präparations- und Kulturmedium 90
2.5.1.3. Präparationsmethode 90
2.5.1.4. Inkubationsmethode 90
2.5.1.5. Beurteilung der Embryonen 91
2.5.1.6. Morphologische Untersuchung von Mäuseembryonen 91
2.5.2. Ergebnisse 92
2.5.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 92
2.5.2.2. Lichtmikroskopische Auswertung von Schnittpräparaten von kultivierten Embryonen und Kontrollen 92
2.5.3. Diskussion 95
2.5.4. Schlußfolgerungen 95
2.6. Einfluß radioaktiv markierter Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die Proteinmuster von kultivierten Mäuseembryonen, dargestellt durch zweidimensionale Elektrophorese 96
2.6.1. Material und Methoden 96
2.6.1.1. Versuchstiere 96
2.6.1.2. Präparations- und Kulturmedium 96
2.6.1.3. Präparationsmethode 96
2.6.1.4. Inkubationsmethode 96
2.6.1.5. Beurteilung der Embryonen 97

Seite

2.6.1.6. Zwei-dimensionale Elektrophorese 97
2.6.1.6.1. Proben-Präparation 97
2.6.1.6.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF) - 1. Dimension 98
2.6.1.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) - 2. Dimension 99
2.6.1.6.4. Gel-Auswertung 99
2.6.1.6.4.1. Fotografische Wiedergabe der Proteinmuster 99
2.6.2. Ergebnisse 100
2.6.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 100
2.6.2.2. Einfluß radioaktiv markierter Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die 2DE-Proteinmuster von in vitro-Embryonen 100
2.6.3. Diskussion 104
2.6.4. Schlußfolgerungen 107
2.7. Darstellung der Proteine von kultivierten Mäuseembryonen durch zwei-dimensionale Elektrophorese und Fluorographie 107
2.7.1. Material und Methoden 107
2.7.1.1. Zwei-dimensionale Elektrophorese mit radioaktiv markierten Proteinen 108
2.7.1.2. Fluorographie 109
2.7.2. Ergebnisse 110
2.7.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation 110
2.7.2.2. Fluorographie zwei-dimensionaler Proteinmuster von kultivierten Mäuseembryonen 111
2.7.3. Diskussion 113
2.7.4. Schlußfolgerungen 115
3. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen 116
4. Literaturverzeichnis 119
5. Anerkennung 127
6. Lebenslauf 128

1. Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Reihe von Methoden, die dazu dienen sollen, Mäuseembryonen physiologisch optimal zu kultivieren, bei gleichzeitig hoher radioaktiver Markierung ihrer Proteine. Die Gewinnung der Proteine unter natürlichen Bedingungen und mit hoher radioaktiver Markierung ist eine notwendige Voraussetzung, um die Proteine von Mäuseembryonen durch zwei-dimensionale Elektrophorese (2DE) darstellen und analysieren zu können. Die Auftrennung von Proteinen durch 2DE und die Sichtbarmachung der Proteine durch Fluorographie ist heute die empfindlichste Methode, um hochkomplexe Proteinlösungen zu analysieren (KLOSE, 1983). Auf diesem Wege soll das Gesamtprotein einzelner Mäuseembryonen in hunderte oder tausende von einzelnen Proteinen aufgetrennt werden. Das Fernziel wäre, möglichst alle Proteine eines Embryos sichtbar zu machen.

Nach klassischer Vorstellung ist jedes Protein Ausdruck eines einzelnen Gend (ein Gen- ein Protein-Theorie). Veränderungen der Gene durch Mutationen beispielsweise wirken sich im elektrophoretischen Muster der Proteine aus: Qualitative Veränderungen führen - zumindest in einem gewissen Prozentsatz aller Fälle - zu Positionsunterschieden für das betroffene Protein, quantitative Veränderungen (Intensivitätsunterschiede) sind als solche im elektrophoretischen Proteinmuster zu erkennen. Damit wird deutlich, daß die Darstellung und Analyse hochkomplexer zwei-dimensionaler Proteinmuster gerade für die Genetik von großer Bedeutung ist. Hier weist diese Methodik für verschiedene Probleme einen neuen Weg, z.B. für die Mutagenitätstestung am Säugetier (in vivo) oder für die Diagnose und Untersuchung der Äthiologie von Erbkrankheiten. Die Maus ist für solche Untersuchungen ein sehr geeignetes Versuchsobjekt. Genetisch ist die Maus das am besten analysierte Säugetier. Ferner ist über die Embryologie und die Kultivierung von Embryonen bei der Maus vieles bekannt.

Nach 2DE können die Proteine entweder durch Färbung oder durch Fluorographie (Scintillation - Autoradiographie; BONNER u. LASKEY, 1974; LASKEY u. MILLS, 1975) dargestellt werden. Die Fluorographie setzt die radioaktive Markierung der Proteine voraus. Sie hat jedoch zwei entscheidende Vorteile: 1.) Sie ermöglicht eine extrem hohe Auflösung der Proteine. 2.) Sie erlaubt die Untersuchung der Syntheserate der Proteine.

Die Markierung der Proteine der Maus durch radioaktive Aminosäuren kann auf zwei Wegen erfolgen: 1.) Intravenöse Injektion der radioaktiven Aminosäuren in die adulte Maus. Dabei würden die Proteine aller Gewebe markiert, im Falle der Trächtigkeit der Maus auch die Embryonen bzw. Föten. 2.) Kultivierung von Mäuseembryonen und Einbau der radioaktiven Aminosäuren über das Kulturmedium. Die erste Methode hätte den Vorteil, daß die Organe bzw. Embryonen während der Markierung in ihrem physiologischen Zustand belassen werden. Nachteile dagegen sind: Die Tiere müssen hohe Dosen an Radioaktivität erhalten, um den konkurrierenden Einbau natürlicher Aminosäuren gering zu halten. Das bedeutet möglicherweise Strahlenschäden für die Maus (ZEINDL u. KLOSE, 1984) und eine hohe Steigerung der Kosten.

- In einem Vorversuch wurden Tag-10-Mausembryonen mit 20 µCi ^{35}S-Methionin/ml Medium für 8 Stunden inkubiert und der Einbau an Radioaktivität in ihre Proteine bestimmt. Die Kultivierung erfolgte dabei unter den in dieser Arbeit ermittelten optimalen Kulturbedingungen. Parallel dazu wurden trächtige Mäuse des gleichen Entwicklungsstandes der Embryonen mit der gleichen Konzentration an ^{35}S-Methionin (20 µCi/ml Blut der Maus) i.v. gespritzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit der in vitro-Embryonen wurden auch die in vivo markierten Embryonen aus dem Muttertier entfernt und untersucht. Hierbei zeigte es sich, daß die markierten in vivo-Embryonen nur 1/15 der Radioaktivität aufnehmen konnten, die die in vitro-Embryonen tatsächlich inkorporierten. -

Der andere Weg, d.h. die Markierung der Proteine über Embryokulturen schien uns aus den genannten Gründen der geeignetere zu sein. Die Anwendung dieser Methode ist aber nur unter bestimmten Voraussetzungen sinnvoll: Optimale Präparation und Kultivierung der Embryonen, gleichmäßige Aufnahme und Verteilung der radioaktiven Aminosäuren durch die Embryonen, Ausschluß der Schädigung des Embryos durch die radioaktive Substanz bei gleichzeitig möglichst hohen Einbauraten. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit diesen Problemen.

Die Ergebnisse zeigen, daß vor allem für Postimplantationsembryonen des 10. Entwicklungstages Bedingungen gefunden werden konnten, die sowohl den geforderten hohen Einbau an Radioaktivität in die Proteine als auch eine offenbar unbeschadete Kultivierung der Embryonen gewährleisteten. Als optimal wurden hierbei eine Inkubationsdauer von 8 Stunden bei einer Radioaktivität von 150 µCi/ml Medium ermittelt. Als beste Präparationsmethode erwies sich ein Vorgehen, bei dem der Dottersack der Embryonen erhalten blieb, aber für die Kultivierung geöffnet wurde. Die Anzahl von 4 Embryonen einer Maus pro Kulturflasche und eine Kultivierung in einem Rotorsystem (fließendes System) bei 37°C erschienen dabei am geeignetsten. Diese Kulturbedingungen führten trotz der hohen Radioaktivität im Medium zu keiner gesteigerten Schädigung der Chromosomen. Ebenso zeigten lichtmikroskopische Untersuchungen von histologischen Präparaten der kultivierten Embryonen keine wesentliche Nekrosenbildung oder das Auflösen der Strukturen innerer Gewebe und Organe. Die Analyse von zwei-dimensionalen Proteinmustern deutete ebenfalls nicht auf eine Schädigung der Embryonen hin, weder durch die Kultivierung als solches noch durch die Verwendung der radioaktiv markierten Aminosäuren. Durch zwei-dimensionale Elektrophorese und Fluorographie wurden von einzelnen Mäuseembryonen (Tag 10 der Entwicklung) Proteinmuster mit 3431 (Gelgröße 29,5 x 23 x 0,9 cm) bzw. 5482 (Gelgröße 42 x 33 x 0,085 cm) Polypeptiden erreicht.

2. EXPERIMENTE, ERGEBNISSE, DISKUSSIONEN

2.1. Kulturbedingungen für Postimplantationsembryonen

2.1.1. Material und Methoden

2.1.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten Mäuse vom NMRI-Auszuchtstamm aus der Tierversuchsanstalt Hannover. Die Tiere wurden bei 23 ± 2°C und 55 ± 5% relativer Luftfeuchtigkeit in einem festgelegten Licht-Dunkel-Rhythmus (Licht von 9.10 - 20.00 Uhr) unter Spf-Bedingungen im Tierstall gehalten. Als Nahrung (Fertigfutter) wurden Altromin ^{R}1324 und Wasser ad libitum gegeben. Nach dem hier im Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie üblichen Modus erfolgte das Zusammensetzen der "Elterntiere" (1♂ + 5♀) jeweils für etwa 3 Stunden am frühen Morgen (6.00 - 9.10 Uhr). Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität.

Für die Untersuchungen der Kulturbedingungen von Postimplantationsembryonen wurden nur NMRI-Mäuseembryonen am Tag 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung verwendet. Für die Bestimmungen des Proteingehalts der Embryonen während der Organogenese wurden noch zusätzlich Tag 9 Embryonen herangezogen.

2.1.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente eine selbst hergestellte und modifizierte Tyrode-Salzlösung (PAUL, 1970), die in 1 Liter folgende Substanzen (Merck, Darmstadt, in der Qualität "pro analysi") enthielt:

Tyrode-Lösung:	NaCl	8	g
	KCL	0,2	g
	$CaCl_2$	0,2	g
	$MgCl_2.6H_2O$	0,1	g
	$NaH_2PO_4.H_2O$	0,05	g
	Glucose	1	g
	$NaHCO_3$	1	g
	Phenolrot	0,004	g
	Ficoll	5	g (Sigma, München)

und 10 ml 1M Hepes-Puffer (Serva, Heidelberg). Alle Substanzen zusammen wurden mit Tridest auf das Endvolumen von 1 l aufgefüllt.

- Phenolrot diente dabei als Indikator sowohl für die Dauer der Begasung dieses Mediums im Experiment, als auch generell für das sichtbare Umschlagen des pH-Wertes von leicht basisch zu sauer. Dies stellt auch gleichzeitig ein "Verbrauchtsein" der balancierten Salzlösung dar, indem die rotviolette Tyrode-Lösung gelb (sauer $\hat{=}$ pH $<$ 7) wird.

- Ficoll verhinderte ein direktes Anwachsen der inkubierten Embryonen untereinander sowie ein Festkleben an der Glaswand der Bördelflaschen.

- Schließlich erwies sich das Vorhandensein von 1M Hepes-Puffer als unbedingt notwendig, um den pH-Wert auch auf längere Zeit konstant leicht basisch zu erhalten. Wird nach diesem Rezept die Tyrode-Lösung hergestellt, ergibt sich ein pH-Wert von 7,2 - 7,4.

- Dieses "Präparationsmedium" wird sofort nach der Herstellung bei -20°C eingefroren und aufbewahrt. Erst am jeweiligen Versuchstag und etwa 30 min vor Tötung der ersten Versuchsmaus wurde dieses Medium auf 37°C erwärmt und dann verwendet.

In dieser Arbeit bildet 1 ml der erwärmten Tyrode-Lösung - mit oder ohne die Zugabe der gewünschten Menge an radioaktiv markierten Aminosäuren - das Kulturmedium.

2.1.1.3. Präparationsmethoden

Schwangere Mäuse wurden am frühen Morgen der Graviditätstage 9 bis 12 durch Genickbruch getötet. Der Uterus jeder trächtigen Maus wurde vollständig entnommen und in einer Petrischale mit erwärmter (nicht über 37°C) Tyrode-Lösung gründlich gespült. Die Embryonen eines Uterus wurden vereinzelt und in einer weiteren Petrischale bei Raumtemperatur der Tyrode-Lösung unter einem Stereomikroskop (Zeiss, Stereomikroskop IVb) mit Hilfe von spitzen Inox-Pinzetten (Dupont, Nr. 5) präpariert. Diese Präparation sollte in folgenden Schritten so ablaufen, daß weder der Dottersack noch die Placenta und somit auch nicht das Amnion und der Embryo selber punktiert oder sonstwie verletzt würden.

Zuerst wurde ein "vereinzelter Embryo" von der einen Anschnittstelle her (siehe Abbildung 1) auf direktem Wege zur anderen Schnittstelle in kleinen Schritten so aufgerissen, daß man die Uteruswand einfach abstreifen konnte. In Höhe der dann meist gut erkennbaren Placentaregion (Placenta-Embryonalhüllengrenze) wurde dann mit der einen Pinzette vorsichtig angesetzt und mit der anderen Pinzette diese Stelle aufgerissen, ohne zu tief einzudringen, damit die Placenta und der Dottersack unverletzt blieben (Abbildung 2). Dem Verlauf der Placentaregion folgend wurde so durch weiteres Aufreißen der Embryo mit seinen Eihüllen von der Decidua befreit. Auf die gleiche Weise ließ sich auch die Reichert-Membran entfernen, so daß nur noch der Embryo mit Amnion, Dottersack und Placenta zu sehen war (Abbildung 3).

Zur späteren Inkubation gelangten sowohl Embryonen wie bisher beschrieben (Tag 10 vor allem) als auch Embryonen (Tag 9, 10, 11 und 12), bei denen noch zusätzlich der Dottersack in einer relativ Blutader-freien Region etwas eingeschnitten war. Dieser Einschnitt mußte groß genug sein, daß ein Verheilen während der Inkubation ausgeschlossen werden konnte, aber andererseits doch so schmal sein, daß ein Herausrutschen des Embryos unmöglich sein sollte. Diese Präparationsmethode wurde in der gesamten vorliegenden Arbeit als Dottersack-offen oder kurz DO-Präparation bezeichnet und die so präparierten Embryonen als DO-Embryonen (Abbildung 3 a).

Andere Präparationsmethoden wurden in diesem ersten Kapitel nicht angewandt, seien aber der Obersichtlichkeit und dem sachlichen Zusammenhang wegen an dieser Stelle bereits erwähnt.

Embryonen, bei denen außer dem Dottersack auch das Amnion geöffnet war, wurden als DAO-Embryonen (Dottersack und Amnion offen) und diese Präparationsmethode als DAO-Präparation bezeichnet. Hierbei sollte ebenfalls wie bei der DO-Methode ein Verheilen der jetzt zwei "Einschnittstellen" und ein Herausrutschen der Embryonen während der Inkubation vermieden werden.

Embryonen, die ohne jegliche Eihüllen und ohne Placenta zur Kultivierung gelangten, wurden Nackte-Embryonen oder kurz N-Embryonen genannt und diese Präparationsmethode demzufolge N-Präparation (Abbildung 3 b).

N-Embryonen, die vor der Inkubation noch zusätzlich in drei Teile (Kopf, Torso und Schwanz) zerschnitten wurden, erhielten die Bezeichnung NZ-Embryonen (nackt und zerschnitten) und diese Präparationsmethode wurde NZ-Präparation genannt.

Abbildung 1: "Vereinzelter Embryo" mit allen Eihüllen, Decidua und Uteruswand. Von der einen Schnittstelle in Pfeilrichtung zur anderen Schnittstelle wird die Uteruswand aufgerissen.

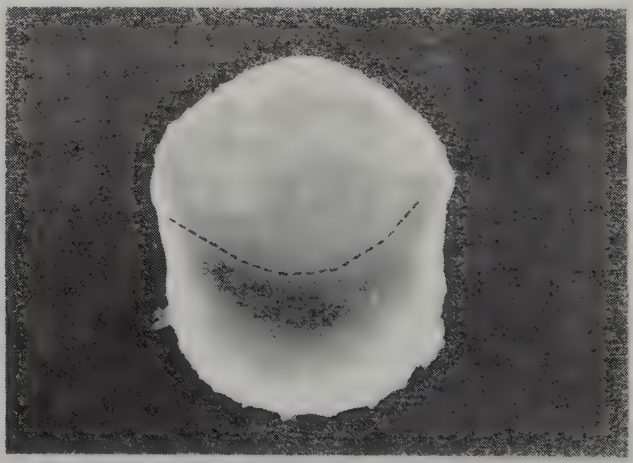


Abbildung 2: Embryo mit Eihüllen und Decidua, Uteruswand entfernt; gestrichelte Linie zeigt deutlich die Placenta-Embryonalhüllengrenze, oberer durchscheinender Pol beinhaltet den Embryo, unterer dunkel und undurchsichtig erscheinender Pol verbirgt die Placenta.

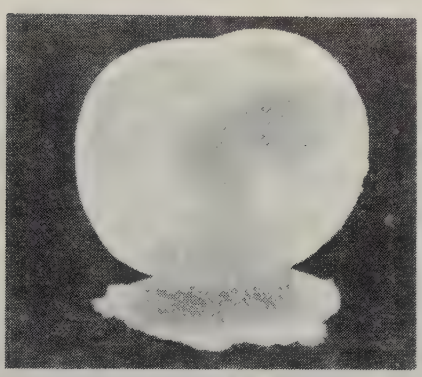


Abbildung 3 : Embryo nur noch mit Placenta, Dottersack und Amnion. Lage des Embryos und einiger Hauptadern des Dottersackes gut zu erkennen.

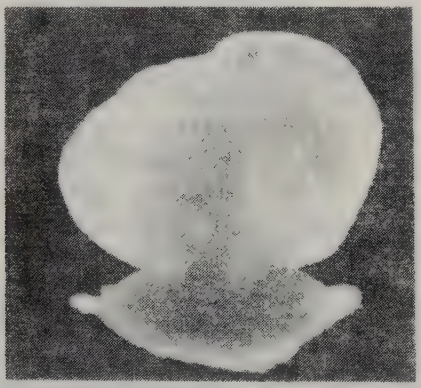


Abbildung 3 a: Embryo mit Placenta, Amnion und geöffnetem Dottersack. Typischer sogenannter DO-Embryo, wie er auch inkubiert wird.

Abbildung 3 b: Embryo ohne Eihüllen und ohne Placenta; typischer N-Embryo.

2.1.1.4. Inkubationsmethoden

In der Regel wurden vier DO-Embryonen einer Maus mit 1 ml Medium (Tyrode-Lösung) in einer 50 ml Bördelflasche kultiviert. Die Flasche wurde mittels einer Bördelzange mit einem Gummistopfen und einer Metallkappe luftdicht verschlossen (Abbildung 4). Die Be- und Entgasung der Inkubationsflasche erfolgte mit Hilfe zweier Injektionsnadeln (Braun-Melsungen; 0,70 x 32 mm) durch den Hohlstopfen für 2 min mit einem Gasgemisch aus 95% O_2/5% CO_2 bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,4 l/min (NEW u. COPPOLA, 1970 a, b; NEW, COPPOLA u. TERRY, 1973; COCKROFT, 1973; KOCHAR, 1975). Die so begaste Flasche wurde dann horizontal in eine rotierbare Scheibe eingeklemmt (ähnlich wie bei KOCHAR, 1975; DEUCHAR, 1976; NEW u. COCKROFT, 1979), die sich in einem auf 37°C erhitzten Brutschrank (Memmert-Brutschrank, BvW 40, Schwabach) befand. Danach wurde die motorgetriebene Rotationsscheibe mittels eines Geschwindigkeitsreglers immer auf 8 U/min für die Inkubationsdauer von 4 Stunden eingestellt (Abbildung 5).

- Der Antriebsmotor der Rotationsscheibe gab während des Betriebs Wärme an seine Umgebung ab, deshalb mußte der Brutschrank auf 33 - 35°C eingestellt werden und die Scheibe mindestens 1 Stunde vor Versuchsbeginn in Betrieb sein. Nur so konnte eine Überhitzung vermieden werden, die fatale Folgen für die inkubierten Embryonen gezeigt hätten (siehe COCKROFT u. NEW, 1975). -

Die Kultivierungszeit begann mit dem Anstellen der Rotationsscheibe nach Befestigung der mit Embryonen, Medium und Gasgemisch gefüllten Inkubationsflasche und endete mit deren Abstellung bzw. bei mehreren Inkubationsflaschen mit dem Herausnehmen derselben.

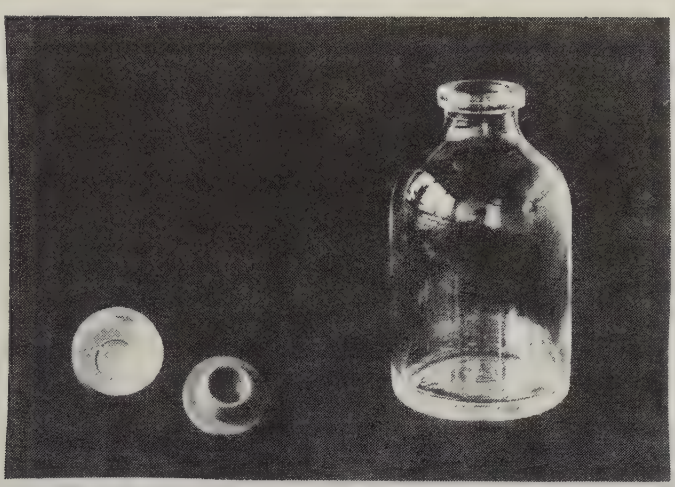


Abbildung 4: Eine 50 ml Bördelflasche mit Hohlstopfen und Metallkappe.

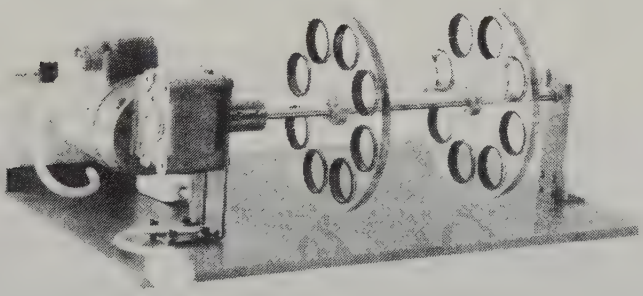


Abbildung 5: Rotorgestell mit Antriebsmotor und Geschwindigkeitsregler, festmontiert auf eine PVC-Scheibe, wie sie später in einen Brutschrank installiert werden kann.

Nach dieser Inkubationsmethode wurden Tag-9, -10 und 11-Embryonen kultiviert. Eine Ausnahme bildeten Tag-12-Embryonen, die nicht als "Vierer-Gruppe" inkubiert werden konnten, sondern nur als Einzelembryonen pro Bördelflasche. Der Grund lag darin, daß bereits ein Tag-12-Embryo ein so großes Volumen besitzt, daß er von dem vorgegebenen 1 ml Medium gerade bedeckt bzw. umgeben werden kann. Bei vier Embryonen in einer Inkubationsflasche würde das Medium die Embryonen nur ungleichmäßig benetzen, wodurch keine gleichmäßige Versorgung mehr gewährleistet werden würde. Außerdem wäre dann auch die Gefahr eines Austrocknens der Embryonen gegeben.

Zusätzlich wurde in Vorversuchen noch ein weiteres einfaches Kultivierungssystem untersucht. Dazu wurden die vier DO-Embryonen einer Maus einzeln in 10 ml Tyrode-Lösung in einer Bördelflasche verschlossen und nach der Begasung in ein 37°C Schüttelwasserbad (Lauda CS 20) bei Geschwindigkeitsstufe 5 inkubiert. Der Inkubationszeitraum währte bis zum Morgen des folgenden Tages, also etwa 22 Stunden lang. Um einen direkten Vergleich zwischen den Inkubationsmethoden "Rotor" und "Schüttelwasserbad" zu bekommen, wurden auch die "Rotor"-inkubierten DO-Embryonen (vier Embryonen einer Maus) einzeln in 10 ml Tyrode-Lösung in einer Bördelflasche verschlossen, begast und für 22 Stunden in vitro kultiviert. Diese Untersuchungen wurden an Tag 10- und -11-Embryonen durchgeführt.

2.1.1.5. Beurteilung der Embryonen

Nach Inkubationsende wurde der Inhalt einer Bördelflasche jeweils in eine Petrischale geschüttet und sofort unter der Stereolupe untersucht. Dabei wurden im einzelnen folgende Beobachtungen notiert: 1. Herzschlag
2. Durchblutung
3. Schwanzsomitenzahl
4. Besonderheiten

zu 1. Der Herzschlag der Embryonen wurde zum einen nach dem Vorhanden- oder Nicht-Vorhandensein und zum anderen nach der Intensität der Herzschlagfrequenz beurteilt. Diese Beobachtungen wurden zusammengefaßt und in einer Scala, die von (-) bis (+++) reichte, bewertet.
Das Zeichen (-) bedeutete: Kein Herzschlag sichtbar.
Bei einem (+) allein besagte dies: Schwacher bzw. befriedigender, aber auf jeden Fall sichtbarer Herzschlag, der bisweilen auch sehr langsam aber dann kräftig sein konnte.
Bei (++) wurden guter (schneller), kräftiger und vor allem auch regelmäßiger Herzschlag beobachtet.
Erst bei (+++) wurden Herzschlag und Herzschlagfrequenz als optimal angesehen, wobei sich sehr deutlich die beiden Herzkammern in voller ununterbrochener Tätigkeit befanden.

zu 2. Bei der Durchblutung wurde sowohl auf die körpereigene Durchblutung wie auch der des Dottersackes geachtet. Ebenfalls wurde hierbei das Ergebnis auf einer Scala von (-) bis (+++) bewertet.
Das Zeichen (-) bedeutete: Keine aktive Durchblutung sowohl im Körper des Embryos als auch in dessen Dottersack, geschweige denn in der Nabelschnur zur Placenta hin.
Ein (+) besagte, daß zwar noch aktive Durchblutung relativ überall stattfand, natürlich im Rahmen der Herzschlagfrequenz, aber doch schon massiv Blutpfropfen (Thrombosen) sichtbar waren, die die Durchflußgeschwindigkeit des Blutes besonders im Dottersack fast zum Erliegen brachten bzw. es nur noch kurze Zeit benötigte, ehe der Stillstand eintreten würde.
Bei (++) wurde überall eine gute aktive von der Herzfrequenz bestimmte Durchblutung beobachtet, wobei es schon vorkommen konnte, daß im Embryokörper alles op-

timal verlief, während im Dottersack die Durchblutung deutlich verlangsamt ablief bzw. das Blut zähflüssiger und auch von der Farbe her dunkler wurde.
Bei (+++) floß das Blut so schnell und überall gleichmäßig durch die Adern, wie es die Herzfrequenz erlaubte und man als Beobachter annehmen konnte, daß es noch einige Zeit wie in vivo weiterfließen würde. Besonders deutlich war hierbei der Embryo-Placentare-Blutkreislauf zu beobachten.

zu 3. Beim Auszählen der Schwanzsomiten wurde vom Beginn der hinteren Extremität ab die Somitenzahl bestimmt. Dabei kam es häufig vor, daß die letzte Schwanzsomite recht lang sein konnte bzw. keine weiteren Unterteilungen erkennbar waren und deshalb manchmal die Bezeichnung "+ langes Ende" oder nur "+ Ende" zusätzlich zu der Somitenzahl angegeben erhielten.

- Die Auszählung der Schwanzsomiten allein ist insoweit legitim, als COCKROFT (1976) bei Vergleichen von in vivo und in vitro-Untersuchungen (allerdings an Rattenembryonen) nachweisen konnte, daß erst nach 12 Stunden Inkubation ein Verkümmern oder überhaupt Mißbildungen des Schwanzendes einsetzen. Die Somitenzahl soll demnach statistisch gesehen bei in vivo- und in vitro-Kultivierung bis zu 12 Stunden unverändert sein, d.h. nicht voneinander signifikant abweichen.
Das von COCKROFT verwendete Kulturmedium bei dieser Untersuchung ähnelte mit 75% Tyrode-Lösung und 25% Rattenserum meinem "Kulturmedium". In der Diskussion wird noch einiges zu diesem Thema erklärt werden. -

zu 4. Unter der Rubrik Besonderheiten wurden z.B. auffällige Mediumveränderungen (Trübung, Farbumschlag und damit pH-Veränderungen), Fehlverhalten der Embryonen (Heraus-

rutschen aus den Embryonalhüllen, Verdrehungen der Nabelschnur oder Aufblähungen des Bauchraumes) oder sonstige morphologische oder physiologische Abnormitäten notiert.

Wenn alle Beobachtungen voll aus positiv (Herzschlag (+++), Durchblutung (+++), Somitenzunahme und keine Besonderheiten) bewertet wurden, bedeutete dies, daß die Embryonen die Kultivierung "normal" überlebten. Diese Beurteilung galt für inkubierte Embryonen mit geschlossenen Eihüllen, für die DO-Embryonen und die im nächsten Kapitel (2.2.) verwendeten DAO-Embryonen.

- N- und NZ-Embryonen zeigten bereits bei der Inkubation einen stark verminderten Herzschlag und so gut wie keine aktive Durchblutung. Deshalb wurden diese Embryonen nach der Inkubation als "normal" bezeichnet, aufgearbeitet und ausgewertet, wenn sie noch folgende Eigenschaften aufwiesen: Verlangsamter, aber deutlicher Herzschlag, Konsistens fest, keine Deformationen und keine Zersetzungs- oder Auflösungserscheinungen des gesamten Körpers bzw. der Körperteile. -

Nach Feststellung der eben erwähnten Beobachtungen in das jeweilige Versuchsprotokoll wurden die Embryonen sofort mehrfach in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) gespült, um dann im letzten "Spülbad" von allen Embryonalhüllen und der Placenta abpräpariert zu werden, d.h. Placenta, Dottersack und Amnion wurden entfernt, bis nur noch der nackte Embryo übrig blieb.

- Die späteren N- und NZ-Embryonen mußten nur mehrfach gründlich mit physiologischer Kochsalzlösung gespült werden.

2.1.1.6. Aufarbeitung der Embryonen

Nach der Beurteilung der Embryonen wurde jeder freipräparierte Embryo einzeln in 2 ml kalter 10%iger TCA-Lösung (Trichloressigsäure von Merck,Darmstadt) über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt,

ehe die eigentliche Aufarbeitung begann.

Die Aufarbeitung verlief folgendermaßen:

1. Die einzelnen Embryonen wurden in einem 5 ml Glashomogenisator mit eingeschliffenem Pistell (Pistell ohne Warzen) von Braun/Melsungen unter Standardbedingungen bei 750 U/min homogenisiert.
2. Das jeweilige Homogenat wurde sodann in spitzkonische Glaszentrifugenröhrchen überpipettiert und in einer 4°C gekühlten Heraeus-Christ-Bodenzentrifuge (Typ Minifuge) für 10 min bei 5 000 U/min zentrifugiert.
3. Der Überstand wurde weggekippt und das Homogenat mit dem passenden Glasstab (für jedes Zentrifugenglas paßgerechte Glasstäbe hergestellt) und der Restflüssigkeit wieder aufgerührt.
4. Der Rückstand wurde wieder mit 2 ml kalter 10%iger TCA aufgefüllt und erneut 10 min bei 5 000 U/min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt.
5. Nach dem "Waschen" mit TCA wurde der Rückstand mit 2 ml eines kalten Äther-Äthanol-Gemisches (bestehend aus 1 Teil Äther + 3 Teilen Äthanol) aufgefüllt, aufgerührt und wieder bei 5 000 U/min für 10 min zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.
6. Erst nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand korrekt abpipettiert. Zu dem nun verbliebenen Rückstand wurden zuerst 100 µl Aqua dest gegeben und wieder mit dem dazugehörenden Glasstab gründlich aufgerührt; sodann wurden 100 µl 40%iger NaOH hinzugefügt und alles gründlich vermengt. Das jeweilige "Embryohomogenat" befand sich nun in einer 0,2 ml 20%igen Natronlauge.
7. Dieses Homogenat (Tag 9 und 10 weißlich aussehend, Tag 11 und 12 gelblich) wurde in konische Zentrifugengläser mit Schraubverschluß überpipettiert, verschlossen und für 1 Stunde bei 80°C in ein Schüttelwasserbad (MGW, Lauda CS 20,

Deutschland) bei hoher Frequenz inkubiert. Nach 30 min bzw. 45 min im Wasserbad wurden die Gläser kurz auf einem Schüttler aufgerührt und dann wieder reinkubiert. Im Idealfall sollten sich nach einer Stunde alle Proteine gelöst haben. Die Flüssigkeiten wären dann je nach dem Proteingehalt und somit auch nach dem Alter der Embryonen entweder klar und durchsichtig (wie Tag 9 und 10 der Embryonen) oder gelb und durchsichtig (Tag 11 und 12).

8. Nach Abkühlung und Kondensation für 10 min in einem Kühlschrank erfolgte letztmalig eine Zentrifugation wieder bei 5 000 U/min für 10 min bei 4°C, um eventuelle Rückstände abzusedimentieren. Der "Überstand" enthielt die gelösten Proteine, die in ein Eppendorf-Reagenzgefäß überpipettiert und im Kühlschrank zur weiteren Verwendung aufbewahrt wurden.

Das Ergebnis einer Embryonen-Aufarbeitung besagte also, daß der Proteingehalt eines Embryos in 200 µl einer 20%igen Natronlauge vorlag (die Probemenge betrug 200 µl).

2.1.1.7. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach LOWRY u. Mitarbeitern (1951) in einer etwas abgewandelten Form durchgeführt Diese Veränderung lag in dem Natronlaugenanteil der Proben begründet, dem Rechnung getragen werden mußte.

Die LOWRY-Stammlösungen bestanden aus:

(A) 0,2 ml 2%ige Na_2CO_3 in 0,1 n NaOH
(B) 0,2 ml $CuSO_4$ 1%ig
(C)19,6 ml K-Na-tartrat 2%ig

(alle Chemikalien von Merck, Darmstadt, pro Analyse).
Die zu messende Probe wurde vorher auf 2%ige Natronlauge verdünnt, d.h. 50 µl Probe (20% NaOH-Gehalt) + 450 µl Aqua dest ergaben 500 µl einer 2%igen Protein(Probe)-Natronlaugen-Lösung. Demzufolge mußte die Standardprobe BSA (Rinderserumalbumin von

Merck, Darmstadt) auf eine 2%ige Proteinlösung gebracht werden, um als Standard dienen zu können. Damit auch wirklich die Standard-gemäßen Voraussetzungen gegeben waren, mußte auch diese Standardprobe wie die Einzelprobe (Embryo-Probe) vorher 1 Stunde bei 80°C im Schüttelwasserbad mit 20%iger NaOH inkubiert und dann mit Aqua dest auf 2%ige NaOH verdünnt werden. Zur Proteinbestimmung wurden dann 0,1 ml Probe mit 0,3 ml Reagenzlösung (bestehend aus A, B und C) gut gemischt und 10 min stehengelassen. Danach wurde wie üblich 0,3 ml Folin-Reagenz (1 Teil Folin + 1 Teil H_2O dest) hinzugegeben, gut gemischt und 30 min stehengelassen. Als Blindwert diente eine 2%ige NaOH-Lösung mit den LOWRY-Lösungen "vermischt", und als Standard diente anstatt einer wassergelösten BSA-Lösung (1 mg BSA/ml) eine 2%ige NaOH-BSA-Lösung gleicher Konzentration. Die Messung selbst erfolgte bei einer Wellenlänge von λ = 750 nm in einem Gilford Spectral Photometer.

Die Auswertung wurde nach folgender Formel durchgeführt:

$$\frac{\text{Ext. der Probe x mg BSA Standard x F}}{\text{Ext. Standard}} = \text{mg Protein/0,2 ml (Embryo)}$$

Ext. = Extinktion
F = Verdünnungsfaktor; in dieser Untersuchung konstant 20.

Nach dieser Methode wurde der Proteingehalt der Tag-9, -10-, -11- und -12-Embryonen berechnet.

2.1.2. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Maus-Embryonen an den Tagen 9, 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung mit geöffnetem Dottersack (DO-Embryonen) unter Standardbedingungen inkubiert und deren Proteingehalt anschließend bestimmt. Standardbedingungen bedeuteten

hierbei, daß vier Embryonen einer Maus der Trächtigkeitstage 9 - 12 in 1 ml Kulturmedium (hier Tyrode-Lösung allein) in einer 50 ml Bördelflasche verschlossen und nach 2-minütiger Begasung mit einem Gemisch aus 95% O_2/5% CO_2 für 4 Stunden in einem 37°C Brutschrank mit einer Rotationsgeschwindigkeit der Kulturflaschen von 8 U/min inkubiert wurden. Eine Ausnahme bildeten Tag-12-Embryonen, bei denen die vier Embryonen einer Maus einzeln kultiviert werden mußten.

Zusätzlich wurde noch der Proteingehalt von nicht-kultivierten Tag-10-Embryonen (in vivo Embryonen) ermittelt, die erst bei Kulturende der in vitro-Embryonen aus trächtigen Mäusen entnommen wurden.

2.1.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Der Zustand der Embryonen nach 4 Stunden in Kultur wurde nach den unter 2.1.1.5. aufgeführten Kriterien beurteilt. Wie aus nachstehender Tabelle 1 hervorgeht, zeigten die kultivierten Embryonen der Untersuchungstage 9, 10 und 11 ein völlig normales Aussehen, vergleichbar mit den in vivo-Embryonen. Bei Tag-12-Embryonen dagegen überlebten nur 50% (≙ 16 von 32 inkubierten Embryonen) diese Kulturbedingungen.

2.1.2.2. Proteinbestimmung in Abhängigkeit vom Alter der Embryonen

Die Proteinbestimmung nach LOWRY u. Mitarbeitern (1951) wurde an Einzelembryonen nach Inkubation unter Standardbedingungen an Tag 9 - 12 der Embryonalentwicklung durchgeführt (siehe 2.1.1.7.). Zusätzlich wurden noch 12 "nicht kultivierte" Tag-10-Embryonen (≙ 3 Mäusen wurden jeweils 4 Embryonen entnommen) in diese Untersuchung mit einbezogen. Die Proteinbestimmung wurde an allen Embryonen, die in Tabelle 1 aufgeführt sind, vorgenommen. Der Proteingehalt der Embryonen stieg mit dem Alter in dieser Entwicklungsphase deutlich an, wobei der Anstieg von Tag 9 zu Tag 10 das 5-fache, von Tag 10 zu Tag 11 das 3-fache und von Tag 11 zu Tag 12 das Doppelte betrug. Kein Unterschied zeigte sich in den Proteinmengen von kultivierten und nicht kultivierten Tag-10-Embryonen.

Tabelle 1: Zustand der Embryonen an Tag 9 - 12 der Embryonalentwicklung nach Inkubation unter Standardbedingungen

Qualifizierung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation***

Untersuchungs-tag	Anzahl der Embryonen	Herzschlag				Durchblutung				Schwanzsomiten	Besonderheiten
		-	+	++	+++	-	+	++	+++		
9	16	0	0	0	16	0	0	0	16	-*	-
10	28	0	0	0	28	0	0	0	2	0 - 8	-
11	16	0	0	0	16	0	0	0	16	13 - 18	-
12**	32	16	0	0	16	16	0	0	16	23 - 28	-

* Tag-9-Embryonen haben noch keine Schwanzsomiten.

** Tag-12-Embryonen wurden einzeln inkubiert.

*** Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien.

Tabelle 2: Proteinbestimmung in Abhängigkeit vom Alter der Embryonen

Alle Werte sind auf mg Protein/Embryo berechnet; die Mittelwerte der Proteinbestimmungen ($\bar{x}$) der untersuchten Tage 9 - 12 sind $\pm$ der Standardabweichung (S) angegeben.

	Tag 9	Tag 10	Tag 10+	Tag 11	Tag 12
Exp. 1	0,084	0,340	0,423	0,958	2,078
	0,113	0,298	0,353	0,970	1,842
	0,082	0,303	0,132	1,021	1,425
	0,092	0,324	0,328	0,929	1,031
Exp. 2	0,069	0,248	0,411	0,878	1,964
	0,049	0,303	0,352	0,918	1,808
	0,054	0,252	0,463	1,072	1,362
	0,055	0,224	0,312	0,773	1,519
Exp. 3	0,098	0,298	0,311	0,674	1,554
	0,067	0,187	0,197	0,994	1.641
	0,094	0,226	0,254	0,965	1,905
	0,071	0,306	0,297	0,715	1,927
Exp. 4	0,035	0,520		0,946	1,635
	0,024	0,450		1,036	1,868
	0,022	0,469		1,109	1,476
	0,022	0,508		1,203	1,578
Exp. 5		0,267			
		0,333			
		0,200			
		0,219			
Exp. 6		0,387			
		0,437			
		0,387			
		0,351			
Exp. 7		0,221			
		0,174			
		0,227			
		0,230			
($\bar{x}$)	0,064438	0,31032	0,31792	0,94756	1,7258
$\pm$ S	$\pm$ 0,0288	$\pm$0,0979	$\pm$0,0944	$\pm$0,139	$\pm$0,228

+Tag-10-Embryonen nicht kultiviert; hiervon wurden 12 Embryonen ($\hat{=}$ 3 Mäuse $\hat{=}$ 3 Exp.) ausgewertet. Die Anzahl der übrigen Proteinbestimmungen ist identisch mit der in Tabelle 1 einwandfrei überlebter Embryonen.

$\bar{x}$ = Mittelwert der Proteinmessungen in mg Protein/Embryo

S = Standardabweichung der Proteinmessung in mg Protein/Embryo

2.1.2.3. Vergleich der Inkubationsmethoden "Rotor" und "Schüttelwasserbad"

In Vorversuchen wurden Tag-10 und Tag-11-Embryonen einzeln in 10 ml Tyrode-Lösung in einer Bördelflasche verschlossen, begast und entweder bei 37°C in einem Schüttelwasserbad oder in einem Brutschrank mit Rotor für 22 Stunden inkubiert (siehe 2.1.1.4.). Insgesamt wurden 12 DO-Embryonen (= 3 Mäuse = 3 Exp.) der jeweiligen Untersuchungstage kultiviert, wobei 6 Embryonen (= 2 Embryonen einer Maus) in ein Schüttelwasserbad und die anderen 6 Embryonen (= die anderen 2 Embryonen einer Maus) in einem Brutschrank mit Rotor inkubiert wurden.

Nach 22 Stunden in vitro zeigten alle getesteten Tag-10- und Tag 11-Embryonen unter beiden Inkubationsmethoden ein Oberleben an. Hierbei war allerdings die Vitalität der Rotor-Embryonen mit (++) für den Herzschlag und (++) für die Durchblutung bei weitem größer als die der Wasserbad-Embryonen mit (+) für Herzschlag und (+) für Durchblutung. Auch der äußere Gesamteindruck sprach eindeutig für die Rotor-Embryonen und damit für diese Inkubationsmethode.

2.1.3. Diskussion

In der Literatur wurden eine Reihe von Untersuchungen über die Kultivierung von Postimplantationsembryonen sowohl für die Ratte als auch für die Maus beschrieben (NEW u. STEIN, 1964; NEW, 1966a; TAMARIN u. JONES, 1968; CLARKSON et al., 1969; NEW, 1971; ROBKIN et al., 1972; COCKROFT, 1973; NEW, 1973; NEW et al., 1973; COCKROFT, 1974; STEELE, 1975; COCKROFT, 1976; NEW et al., 1976b; NEW, 1978; SADLER, 1979; TAM u. SNOW, 1980; SADLER u. NEW, 1981). Es gelang, Embryonen in verschiedenen Altersstufen der Postimplantationsphasen für mehrere Tage in vitro zu kultivieren (z.B. NEW, 1973, Tag 8 - Tag 14 bzw. Tag 7 - Tag 13). Besonders hervorzuheben ist die Arbeit von

NEW (1978), in der alle bis dahin bekannten Kulturmethoden sowohl was den apparativen Aufwand, die verschiedenen Kulturmedien, die altersabhängige Begasung und die Anwendungsmöglichkeiten betreffen, übersichtlich zusammengefaßt sind. Allen gemeinsam ist: 1) Das Töten des Muttertieres durch Genickbruch, 2) das Präparieren der Embryonen in einer Tyrode-Lösung, 3) das Inkubieren bei 37°C, 4) das weitgehend "sterile" Arbeiten während des gesamten Versuchsablaufes und 5) das Bemühen, die Embryonen über einen längeren Zeitraum unter "idealen" Bedingungen zum Überleben zu bringen, denen in vivo entsprechend. Hauptunterschiede zeigten sich in den Kulturmedien und Kultursystemen (Roller-, Rotor-, Petrischale-, Uhrglas-System usw.). Ziel dieses Abschnittes der Dissertationsarbeit war es festzustellen, unter welchen Kulturbedingungen Postimplantationsembryonen (Tag-9, 10, 11 und 12) als DO-Embryonen präpariert, für einen relativ kurzen Zeitraum morphologisch und physiologisch weitgehend normal überleben. Wichtig war dabei vor allem im Hinblick auf die späteren Untersuchungen über den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen, daß die Kultivierung in einem Minimalmedium und in einem möglichst kleinen Volumen stattfinden konnte.

Angeregt durch eine Arbeit von KOCHAR (1975) wurde deshalb hier eine Tyrode-Lösung nicht nur zur Präparation verwendet, sondern mit bestimmten Zusätzen (Hepes-Puffer, Ficoll und Phenolrot) auch als Kulturmedium, hier in der Regel in einem Volumen von 1 ml. Durch diese 1 ml gepufferte Nährstoff-freie-Salzlösung sollte sichergestellt werden, daß nur die radioaktiv markierten Aminosäuren als Nahrung aufgenommen und inkorporiert werden. Somit war ein Verdünnungseffekt mit unmarkierten Aminosäuren auszuschließen,und der Einbau von größeren Mengen an radioaktiven Material wurde ermöglicht.

KOCHAR (1975) zeigte dies deutlich am Beispiel von Tag-11-Mausembryonen (≙ Tag 10 in dieser Untersuchung nach der Ge-

samtsomitenzahl beurteilt), die er mit L-Prolin (1µCi/ml) wahlweise in einer Tyrode-Lösung oder einem Vollmedium (s.u.) für 4 Stunden inkubierte. Die Aufnahme an Radioaktivität war bei ihm aus dem Minimalmedium (Tyrode-Lösung) mehr als 5 x so hoch wie aus dem Vollmedium bei gleich gutem Überleben und Aussehen der Embryonen. Für die relativ kurze Zeit von 4 Stunden Inkubation konnte auf die Verwendung eines der sonst üblichen Kulturmedien für Mauskulturen wie z.B. 20% Rattenserum mit Waymouth-Medium (CLARKSON et al., 1969) oder fötales Kälberserum mit Waymouth-Medium im Verhältnis 1 : 1 gemischt (KOCHAR u. HOFFMAN, 1974; KOCHAR, 1975; AGNISH u. KOCHAR, 1976; SADLER u. KOCHAR, 1976) oder gar Mausserum mit Kälberserum und Waymouth-Medium (HERNANDEZ u. LEGRAND, 1975) verzichtet werden. COCKROFT (1973, 1976) kommt mit seinem Kulturmedium, bestehend aus 75% Tyrode-Lösung und 25% Rattenserum meinem noch am nächsten. Er arbeitete ebenfalls mit demselben Gasgemisch aus 95% O_2/5% CO_2 und geöffnetem Dottersack. Im Gegensatz zu meinem Verfahren jedoch entfernte er das Amnion und ließ den Embryo aus dem Dottersack herausschlüpfen. Er erreichte dabei ein gutes Wachstum und eine Differenzierung der Embryonen für über 24 Stunden in vitro, vergleichbar mit der Entwicklung in vivo. Im Gegensatz dazu zeigte eine Arbeit von NEW (1973), mit Rattenserum verdünnt in verschiedenen Konzentrationen von Tyrode als Kulturmedium, ein schlechteres Wachstum und mangelnde Differenzierung der Embryonen, als wenn er nur Rattenserum verwendete. Allerdings blieb bei ihm der Dottersack bei ansonsten weitgehend gleichen Kulturbedingungen immer verschlossen. Hierbei ist zu ersehen, wie untrennbar Kulturmedium und Kulturmethode für ein erfolgreiches Überleben in vitro verbunden sind. Generell müssen daher für die jeweiligen Fragestellungen die geeigneten Kulturbedingungen herausgefunden werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß die von mir angewandten Kulturbedingungen für Tag-9-, -10- und -11-Embryonen zu einem 100%igen Überleben in vitro führen. Bei Tag-12-Embryonen war

dies jedoch nur in 50% der Fälle eindeutig möglich. Dieser Befund für Tag-12-Embryonen ist nicht weiter verwunderlich, da auch andere Experimentatoren darauf hinwiesen, wie schwierig eine in vitro-Kultivierung gerade älterer Embryonalstadien der Maus ist. Ein wichtiger Grund hierfür ist beispielsweise, daß bei älteren Embryonalstadien die Aufnahme von Nährstoffen nicht mehr durch Diffusion erfolgen kann, sondern ausschließlich über den Embryo-Placenta-Blutkreislauf, der zu seinem eigenen weiteren Aufbau unbedingt den mütterlichen Blutkreislauf benötigt (NEW u. COPPOLA, 1977). Außerdem ist ein "Weiterwachsen" bzw. eine voll funktionsfähige Placenta für längere Zeit in vitro beizubehalten, bisher in noch keinem Kultursystem möglich (NEW, 1978).

Da die Kultivierung der Embryonen hier nur dem Zweck der radioaktiven Markierung der Proteine diente, wurde die Inkubationszeit bewußt nicht all zu weit ausgedehnt; weshalb auf steriles Arbeiten oder diesem Zweck dienenden Zusätze (wie Streptomycin) im Medium verzichtet werden konnte. Auch mußte keine dauernde Erneuerung oder Auswechslung des Mediums und der Begasung erfolgen, wie sie sonst möglich oder bei längerer Kulturdauer für mehrere Tage nötig wären (NEW u. COCKROFT, 1979). In Vorversuchen wurden zwar Tag-10- und Tag-11-Embryonen auch wesentlich länger inkubiert, allerdings dienten diese Untersuchungen mehr zur Feststellung einer geeigneten Inkubationsmethode. Embryonen in frühen Implantations- bzw. Postimplantationsstadien wachsen gut in einem statischen Mediumsystem, z.B. dem sogenannten Uhrglas-Kultursystem (Watchglas culture, NEW u. STEIN, 1964; NEW, 1971). Dieses System ist u.a. die essentielle Standardmethode für Organkulturen (PAUL, 1970). Uhrglas-Kultivierung oder ähnliche Methoden (Falcon plastik Petrischalen) mit statischem (nicht fließendem) Medium sind für Ratten- und Mäuseembryonen bis zu den frühen Ursegmentstadien (25 - 30 Somiten) möglich (NEW, 1978). Etwas ähnliches stellte das "Schüttelwasserbad"-System dar, bei dem das Medium nur hin und her bewegt wurde

und sich nicht in einem ständigen Fließen befand, wodurch eine viel größere Durchmischung des Mediums mit dem umgebenden Gasgemisch erreicht wird. Das "Rotor"-System (ähnlich wie bei KOCHAR, 1975; DEUCHAR, 1976) erbrachte diesen besseren Austausch mit dem umgebenden Gasgemisch, wodurch die Embryonen eindeutig besser in vitro überlebten. Dieses "fließende" Kultursystem wurde deshalb allein weiterhin verwendet. Andere noch bekannte Rotor- oder Rotations-Kultursysteme, die mit intermittierender oder kontinuierlich fließender Begasung arbeiteten (SADLER, 1979; NEW u. COCKROFT, 1979; SADLER u. NEW, 1981), kamen hier nicht in Betracht, da sie wesentlich mehr Medium benötigten und daher große Mengen von radioaktiver Substanz erfordert hätten. Außerdem wurden mit diesen Systemen teilweise andere Entwicklungsstadien (SADLER, 1979; von 2 - 4 Somiten bis etwa 28 Somiten, was nach der hier festgelegten Altersbestimmung der Embryonen Tag 8 bis Tag 10 bedeutet) untersucht bzw. längere Inkubationszeiten bis zu mehreren Tagen in vitro erforscht.

Die Untersuchungen über den Proteingehalt der Embryonen mit zunehmendem Alter in der Embryonalentwicklung (Tag 9 - 12) zeigten den erwarteten Anstieg, der einherging mit steigender Größe und Somitenzahl sowie fortschreitender Organ- und Gewebsentwicklung. Entscheidend war hierbei, daß auch die nicht-kultivierten Tag-10-Embryonen (also in vivo-Embryonen) den gleichen Proteingehalt aufwiesen, wie die kultivierten Tag-10-Embryonen zum selben Zeitpunkt der Aufarbeitung. Das bedeutete, daß in den vier Stunden der in vitro-Inkubation diesbezüglich kein Unterschied zu in vivo-Embryonen gleicher Entwicklungsstufe festzustellen war. Ähnliches zeigten bereits TANIMURA u. SHEPPARD (1970) bei Untersuchungen an in vivo- und 3 Stunden in vitro-Rattenembryonen für die Embryonalentwicklung der Tage 10, 11 und 12. Ähnliche Ergebnisse erhielt SADLER (1979) für Mäuseembryonen an Tag 10 und 11, wobei er allerdings in einem besonderen System Tag-10-Embryonen

für 48 Stunden inkubierte. Dieses letzte Ergebnis von SADLER steht im Widerspruch zu Untersuchungen von BERRY (1968), COCKROFT (1976) und NEW (1973, 1978). Diese Arbeiten sagen übereinstimmend aus, daß mit längerer Inkubation über 12 Stunden trotz einwandfreiem Oberleben und einer Zunahme der Gesamtsomiten der Proteingehalt (immer gemessen nach LOWRY et al., 1951) der Embryonen im Vergleich von in vivo- mit in vitro-Bedingungen abnimmt. Allerdings waren bei ihnen auch die Kulturbedingungen anders. Hier zeigt sich wiederum die Notwendigkeit,für jede Fragestellung die entsprechenden Kulturbedingungen zu erarbeiten, ehe die eigentlichen Untersuchungen begonnen werden können.

2.1.4. Schlußfolgerungen

Die Kulturbedingungen für Postimplantationsembryonen können je nach dem Untersuchungszeitpunkt, der Inkubationsdauer und dem gewünschten Untersuchungsziel sehr verschieden sein. Für die Markierung der Proteine von Mäuseembryonen durch Kultivierung mit radioaktiven Aminosäuren mit dem Ziel, sowohl einwandfreies Überleben als auch optimalen Einbau zu erreichen, sind - entsprechend der durchgeführten Untersuchungen - folgende Bedingungen geeignet:

1) Kulturmedium: eine balancierte Tyrode-Lösung;
2) Inkubationsmethode: 4 Embryonen einer Maus der Trächtigkeitstage 9 - maximal 12, in 1 ml Kulturmedium, in einer 50 ml Bördelflasche verschlossen, begast mit einem Gemisch aus 95% O_2/5%CO_2 für 2 min und inkubiert in einen 37°C Brutschrank bei einer Rotationsgeschwindigkeit der Bördelflaschen von 8 U/min.;
3) Inkubationsdauer: 4 Stunden.

Die Frage nach einer geeigneten Präparationsmethode der Embryonen soll in Verbindung mit der Verwendung und der Art des Einbaues radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen im nächsten Kapitel geklärt werden.

2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen bei unterschiedlichen Präparationsbedingungen

2.2.1. Material und Methoden

2.2.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden,wie unter 2.1.1.1. bereits ausführlich beschrieben, nur NMRI-Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität. Für die Untersuchungen über den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen bei unterschiedlichen Präparationsbedingungen wurden nur Postimplantationsembryonen der Tage 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung verwendet.

2.2.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente eine balancierte Tyrode-Lösung wie sie unter 2.1.1.2. ausführlich dargestellt wurde. Als Kulturmedium wurde 1 ml Tyrode-Lösung mit dem Zusatz von 27 µCi/ ≙ 27 µl einer ^{3}(H)-markierten Aminosäuremixtur (Amersham Buchler, England; code TRK. 440; Radioaktive-Konzentration 1 mCi/ml (37 MBq/ml), bestehend aus 15 essentiellen Aminosäuren, verwendet.

2.2.1.3. Präparationsmethoden

Als Präparationsmethoden wurden hier an allen Untersuchungstagen (Tag 10, 11, 12) die DO- und die N-Präparation angewandt (genaue Beschreibung dieser Methoden siehe 2.1.1.3.). Zusätzlich wurden nur an Tag-10-Embryonen die Präparationsmethoden DAO und NZ durchgeführt, die ebenfalls unter 2.1.1.3. im einzelnen beschrieben sind.

2.2.1.4. Inkubationsmethode

Normalerweise wurden vier Embryonen einer Maus nach gewünschter Präparationsmethode DO, DAO, N oder NZ in einer Bördelflasche mit 1 ml Tyrode-Lösung + 27 µl/27µCi einer ^{3}H-markierten Aminosäuremixtur verschlossen, begast und in einem Brutschrank mit Rotor für 4 Stunden inkubiert (genaue Erklärung dieser Vorgänge siehe 2.1.1.4.). Eine Ausnahme bildeten Tag-12-Embryonen, bei denen zwar ebenfalls vier Embryonen einer Maus präpariert, aber jeder Embryo einzeln inkubiert wurde (ebenfalls unter 2.1.1.4. beschrieben).

2.2.1.5. Beurteilung und Aufarbeitung der Embryonen

Alle Embryonen an Tag 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung wurden nach ihrer jeweils angewandten Präparationsmethode (DO, DAO, N oder NZ) inkubiert und danach auf ihren Zustand hin - wie unter 2.1.1.5. ausführlich geschildert - beurteilt. Anschließend wurden die Embryonen, wie unter 2.1.1.6. aufgeführt, weiterbehandelt und als Einzelproben aufgearbeitet. Bei den zerschnittenen Tag-10-Embryonen (NZ-Embryonen) ergaben jeweils ein Kopf, ein Torso und ein Schwanzstück eine "Embryo"-Einzel-Probe. Ausnahmen bildeten Tag-11- und Tag-12-Embryonen, bei denen auch Körperteile oder Organe davon zu "Einzel"-Proben aufgearbeitet wurden. Diese Proben kamen folgendermaßen zustande:

A) Tag-11-Embryonen: Von den vier Embryonen einer Kulturflasche wurden die Schwänze abgeschnitten und zu einer "Schwanzprobe" kombiniert und aufgearbeitet. Die Restkörper der Embryonen wurden wie üblich einzeln aufgearbeitet und bildeten somit vier Restkörper-Proben.

B) Tag-12-Embryonen: Die Leber und der Schwanz eines einzeln inkubierten Embryos wurden vom Körper abgetrennt. Der Restkörper, zwei Lebern und zwei Schwänze bildeten dann jeweils eine Probe.

Am Ende der Aufarbeitung enthielt jedes Eppendorfreagenzgefäß die präzipitierten und in 20%iger Natronlauge aufgelösten Proteine einer Einzelprobe (sei es ein ganzer Embryo, ein Restkörper, dem nur der Schwanz fehlt, ein Restkörper, dem Leber und Schwanz fehlen, zwei Lebern, zwei oder vier Schwänze) in einem Volumen von 200 µl.

2.2.1.6. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von LOWRY et al. (1951) durchgeführt (siehe 2.1.1.7.). Hierbei wurden jeweils 50 µl der 200 µl-Einzelproben-Protein-Lösung, s.o., verwendet.

2.2.1.7. Radioaktivitätsbestimmung

Normalerweise wurden 50 µl der hergestellten Einzelproben-Protein-Lösung mit 8 ml einer Scintillationslösung und 300 µl 20%iger PCA (Perchlorsäure, Merck, Darmstadt) in einem "Zähltöpfchen" sehr kräftig gemischt und die Radioaktivität in einem Nuclear Chicago Division-Typ Mark II-Flüssigkeits-Scintillationszähler in cpm (Counts per minute) gemessen.

Die verwendete Scintillationslösung wurde dabei folgendermaßen hergestellt:

4	g	PPO (2,5-Diphenyloxazole; von Packard, USA)
50	mg	Dimethyl-Popop (2,2-p-Phenylen-bis-(4-methyl-5-phenyloxazole) (Merck, Darmstadt)
1	l	Toluol ($C_6H_5CH_3$, Ferak, Berlin) für 20 min gut durchmischen und anschließend
500	ml	Triton X-100 (Rohm & Haas, Frankreich) zugeben und ebenfalls 20 min gut durchmischen lassen.

- Diese Scintillationsflüssigkeit wurde kühl im Dunkeln aufbewahrt. Die Zugabe von 20%iger PCA war unbedingt notwendig, da sich sonst die Probe nicht im Scintillationsgemisch löst.

Die Ausbeute an ^{3}H-Counts lag bei dem verwendeten Gerät, gemessen mit dem Externen-Standard, bei etwa 22 - 26% cpm. -

2.2.1.8. Auswertung der eingebauten Radioaktivität

Sowohl der Wert der Proteinbestimmung als auch der der Radioaktivitätsmessung waren immer auf die Gesamtmenge der gelösten Proteinprobe berechnet. Der Quotient aus Radioaktivitätsbestimmung (Zähler) und der Proteinbestimmung (Nenner) ergab dann die tatsächlich während der Inkubationszeit inkorporierte Menge der verwendeten radioaktiv markierten Aminosäuren in die Proteine eines Embryos, eines Restkörpers mit und ohne Schwanz bzw. und ohne Leber, zweier Lebern oder zweier bzw. vierer Schwänze an, je nachdem wie die Probe zusammengesetzt wurde.

2.2.2. Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden Mausembryonen an Tag 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung nach verschiedenen Präparationsmethoden (DO und NZ) unter Standardbedingungen 4 Stunden inkubiert. Daran anschließend wurde der Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen insgesamt oder in Teilen von ihnen gemessen. Zusätzlich wurden noch an Tag-10 DAO- und NZ-Embryonen unter sonst den gleichen Bedingungen inkubiert und ebenfalls auf ihren Einbau an Radioaktivität untersucht.

2.2.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Die Beurteilung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien. Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen zeigten in fast allen untersuchten Fällen (23 von 24 Embryonen, Tag 10; 40 von 44 Embryonen, Tag 11) ein 100%iges "normales" Aussehen nach

der Inkubation. Von den 36 kultivierten Tag-12-DO-Embryonen war das nur bei 10 Embryonen zu beobachten. Die anderen Tag-12-DO-Embryonen überlebten die 4 Stunden in vitro entweder überhaupt nicht (13 Embryonen) und wurden deshalb auch nicht weiter berücksichtigt, oder zeigten bereits mehr oder weniger deutliche Beeinträchtigungen (4 Embryonen waren doch so geringfügig beeinträchtigt, daß sie mit in die Auswertung gelangten). Ähnliches war auch bei den Tag-10-DAO-Embryonen zu beobachten. Von den 24 inkubierten Embryonen überlebten nur 50% (12 Embryonen) einwandfrei, die anderen 50% begannen abzusterben. Ursache dafür war meist ein Herausrutschen aus den Eihüllen, wobei durch Rotationsbewegungen sowohl der Kulturflasche als auch der Eigenbewegungen dieser Embryonen oft die Nabelschnur abgebunden, eingerissen oder vollständig abgerissen wurde. Solche Embryonen wurden nicht weiter in eine Auswertung mit einbezogen.

Die N-Embryonen zeigten in allen Untersuchungen, daß für sie als "normal" bezeichnete Aussehen (siehe Definition bei 2.1.1.5.).

Die NZ-Embryonen zeigten vergleichbares Verhalten nach der Inkubation wie die N-Embryonen, allerdings waren an den Schnittstellen der einzelnen Körperfragmente teilweise beginnende Auflösungserscheinungen erkennbar, die hier aber als vernachlässigbar eingestuft werden.

In der nachfolgenden Tabelle 3 sind alle Ergebnisse, die die Untersuchungstage, die Präparationsmethode, die Anzahl der Embryonen und ihren Zustand nach Kultivierung betreffen, zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 3: Zustand der Embryonen Tag 10 - 12 der Embryonalentwicklung nach verschiedener Präparation und Inkubation in einem "radioaktiven Medium" unter Standardbedingungen

Tag der pränat. Entw. u. Präp.-Methode*	Anzahl der Embryonen	Qualifizierung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation*** Herzschlag -	+	++	+++	Durchblutung -	+	++	+++
10 -DO	24	0	1	0	23	1	0	0	23
10 -DAO	24	0	6	6	12	6	5	1	12
10 -N	24	0	8	16	0	24	0	0	0
10 -NZ	16	0	16	0	0	16	0	0	0
11 -DO	44	1	2	2	39	1	2	1	40
11 -N	32	0	9	23	0	32	0	0	0
12** -DO	36	13	4	8	11	13	4	9	10
12** -N	12	0	3	9	0	11	1	0	0

* Präparationsmethoden: DO = Dottersack offen; DAO = Dottersack und Amnion offen
N = Nackt ; NZ = Nackt und in drei Teile zerschnitten

** Tag-12-Embryonen wurden einzeln inkubiert

*** Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien

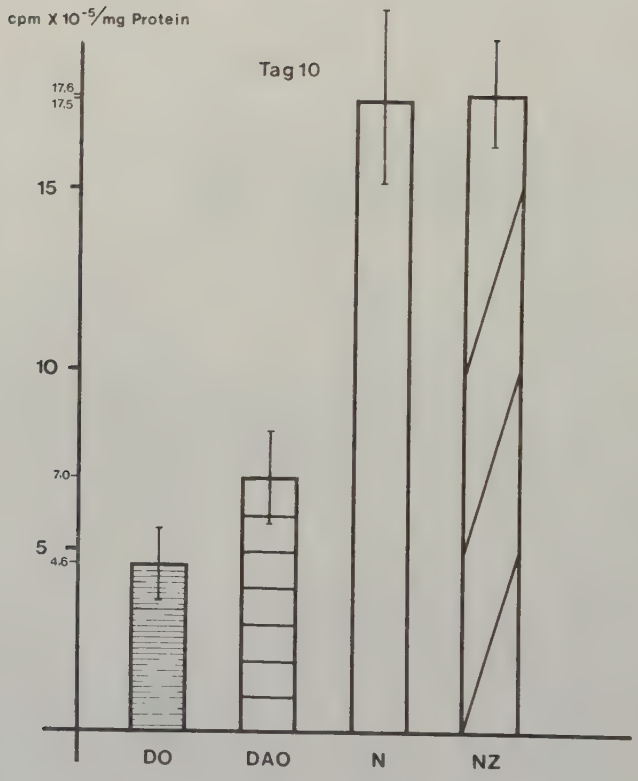
2.2.2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Gesamt-Embryonen

Nach der Inkubation der Embryonen wurde der Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine untersucht. Tag-10-Embryonen bauen als ganze N-Embryonen etwa 3 x (3,8 x im Vergleich zu DO-Embryonen, 2,5 x im Vergleich zu DAO-Embryonen) soviel ein als Embryonen mit Eihüllen (siehe Tabelle 4). Der Einbau radioaktiver Aminosäuren ist etwas stärker gehemmt, wenn nur der Dottersack geöffnet ist, als wenn der Dottersack und Amnion geöffnet sind. Kein Unterschied tritt auf, wenn die N-Embryonen als ganze Embryonen oder zerschnitten (NZ-Embryonen) kultiviert werden (Tabelle 4 und Grafik 1).

Ähnliche Verhältnisse konnten auch bei Tag-11- und Tag-12-Embryonen nachgewiesen werden (Tabelle 5 und Grafik 2). Auch hier bauen die N-Embryonen etwa dreimal soviel ^{3}H-markierte Aminosäuren in ihre Proteine ein als die DO-Embryonen. Die Ergebnisse zeigen ferner, daß der Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren bei Tag-10-Embryonen wesentlich höher ist, als bei den beiden späteren Stadien. An Tag 12 ist der Einbau etwas höher als an Tag 11. Diese stadien-abhängigen Unterschiede zeigten sich bei beiden Präparationsmethoden, DO-Embryonen und N-Embryonen (Grafik 2).

Tabelle 4: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-Embryonen bei unterschiedlichen Präparationsbedingungen (Embryo-Werte ≙ cpm x 10^{3}/mg Protein)

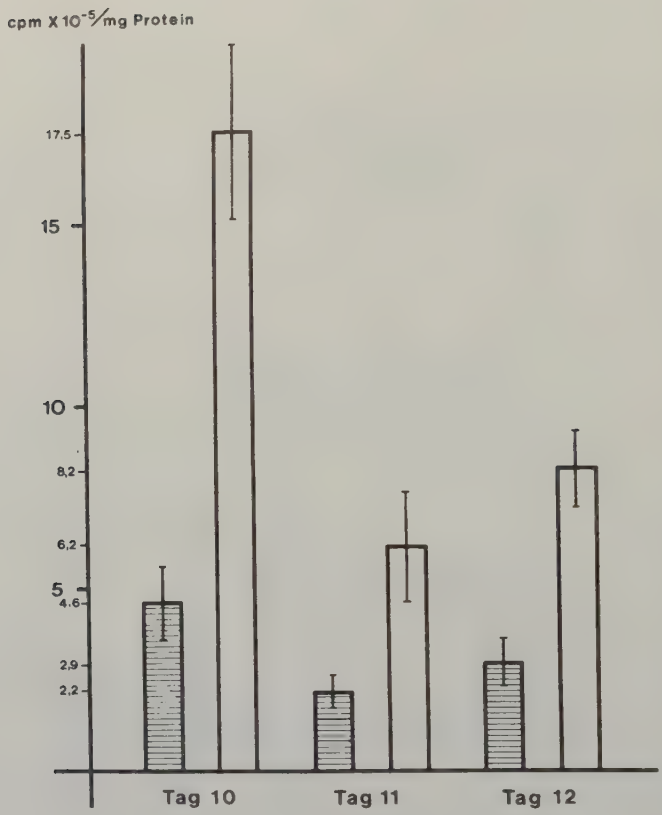
Präparationsmethode	DO (DO-Embryonen)	DAO (DAO-Embryonen)	N (N-Embryonen)	NZ (NZ-Embryonen)
Embryo 1	504,32	650,24	1740,48	1808,40
Embryo 2	438,84	786,84	2226,00	1914,04
Embryo 3	312,04	699,48	1517,80	1910,48
Embryo 4	396,96	615,20	1534,72	1701,08
Embryo 5	498,00	563,20	1835,20	1681,96
Embryo 6	651,72	893,76	1922,12	1631,60
Embryo 7	492,88	713,36	1963,12	1651,00
Embryo 8	298,64	657,76	1933,72	1763,28
Embryo 9	359,16	987,76	2179,92	1596,16
Embryo 10	369,20	587,84	1572,64	2056,56
Embryo 11	597,84	663,40	1937,12	1922,20
Embryo 12	365,20	615,56	1919,88	1660,80
Embryo 13	444,84		1835,72	1530,16
Embryo 14	363,80		1429,56	1877,64
Embryo 15	620,20		1674,36	1805,32
Embryo 16	508,08		1905,80	1637,72
Embryo 17	331,48		1406,96	
Embryo 18	457,20		1744,80	
Embryo 19	497,12		1435,88	
Embryo 20	558,68		1487,60	
Embryo 21	533,08		1898,96	
Embryo 22	401,44		1839,04	
Embryo 23	547,28		1756,08	
Embryo 24			1359,76	
Mittelwerte ±	458,61	702,87	1752,39	1759,28
Standardabweichung	±100	±128	± 241	± 146



Grafik 1: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-Embryonen, die nach vier verschiedenen Präparationsmethoden unter Standardbedingungen inkubiert wurden. Embryonen mit offenem Dottersack (DO) ▤, mit offenem Amnion und Dottersack (DAO) ▤, Nackt (N) □ und in drei Teile zerschnitten und Nackt (NZ) ▨ wurden in 1 ml Tyrode-Lösung mit 27 µl/≙ 27 µC einer ^{3}H-Aminosäure-Mischung für 4 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.

Tabelle 5: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-11- und -12-Embryonen bei unterschiedlichen Präparationsbedingungen

Entwickl.-Tag	Tag 11		Tag 12	
Präparationsmethode	DO (DO-Embryonen)	N (N-Embryonen)	DO (DO-Embryonen)	N (N-Embryonen)
Embryonen in cpm x 10^3/mg Protein	290,37 217,09	765,94 560,41	242,48	740,68
	232,66 180,75	701,31 680,79	276,21	848,69
	136,83 288,16	513,18 600,36	354,79	807,57
	186,03 205,93	562,88 381,88	401,97	704,75
	183,28 231,46	599,31 292,25	195,29	972,78
	223,43 223,93	510,72 359,14	289,34	896,29
	165,65 267,95	446,25 759,86	346,18	745,11
	155,68 276,91	682,77 994,59	261,42	801,18
	212,39 239,42	630,16 471,83	407,92	942,98
	245,73 244,16	689,24 557,33	291,52	762,58
	256,49 213,36	589,78 719,88	208,33	661,31
	118,13 199,51	767,88 563,64	264,53	982,31
	175,84 275,14	801,98	333,31	
	192,70 161,81	725,37	261,43	
	274,91 316,99	718,95		
	158,24 220,94	731,16		
	259,21 294,38	551,02		
	229,99 171,54	523,28		
	208,37 169,53	719,58		
	216,88 244,84	535,53		
Mittelwerte ±	219,17	615,88	295,34	820,69
Standardabweichung	± 46,19	±145	± 65,4	±105



Grafik 2: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-, Tag-11- und Tag-12-Embryonen nach der DO-▤ oder N-□ Präparationsmethode unter Standardbedingungen inkubiert

2.2.2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryo-Teilen

Tag-11- und Tag-12-Embryonen wurden nach der Inkubation in bestimmte Teile zerlegt und der Einbau der ^{3}H-markierten Aminosäuren in die Proteine für die verschiedenen Körperteile getrennt untersucht.

Tag 11: N-Embryonen nach der Kultivierung zeigten, daß im Schwanz (S) etwa die Hälfte (47,16%) mehr Radioaktivität aufgenommen wurde als im Restkörper (R). DO-Embryonen hingegen zeigten keinen Unterschied für Schwanz und Restkörper im Einbau radioaktiver Aminosäuren (Tabelle 6 und Grafik 3).

Tag 12: N-Embryonen inkubiert, zeigen danach den höchsten Einbau im Schwanz (S), in der Leber (L) dagegen den niedrigsten; er liegt hier etwa 15 x niedriger als im Schwanz (= 6,78% des Schwanzwertes). Der Restkörper weist im Vergleich zum Schwanz nur etwa den halben Einbau auf (genau nur 54,49%). Anders dagegen bei den DO-präparierten und inkubierten Embryonen. Hier wurden im Schwanz und im Restkörper gleiche Mengen an Radioaktivität eingebaut, die Leber zeigte sogar einen etwas höheren Einbau als die anderen Embryoteile, wenn auch statistisch nicht signifikant nachweisbar (Tabelle 7 und Grafik 4).

Ein Vergleich der beiden Entwicklungsstadien Tag 11 und Tag 12 zeigt, daß der Unterschied zwischen Schwanz und Körper (gemeint immer der gesamte Restkörper ohne Schwanz; bei Tag 12 errechnet aus Restkörper + Leber aus Tabelle 7) im Einbau der ^{3}H-markierten Aminosäuren bei den N-Embryonen mit Zunahme der Körpergröße größer wird (Vergleiche die Tabellen 6, 7 und 8, siehe Grafik 5).

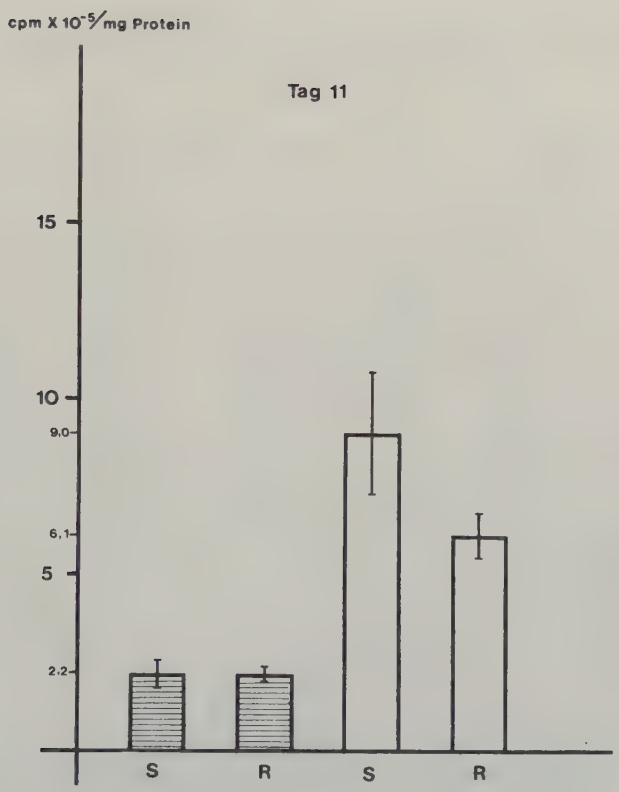
Tabelle 6: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-11-Embryo-Teilen nach unterschiedlicher Präparationsmethode (DO, N) kultiviert

Experimente*	cpm x 10^3/mg Protein			
	DO**		N**	
	Schwanz	R-Körper***	Schwanz	R-Körper
Exp. 1	263,99	210,03	723,04	633,36
Exp. 2	197,74	181,62	987,10	588,95
Exp. 3	171,52	209,51	1063,05	670,96
Exp. 4	208,67	210,16	1126,31	734,27
Exp. 5	272,93	227,83	1071,78	570,63
Exp. 6	264,28	222,30	770,93	549,58
Exp. 7	190,59	255,64	753,50	597,20
Exp. 8	191,25	230,61	743,61	574,37
Exp. 9	184,72	228,82		
Exp. 10	257,81	207,39		
Gesamtmittelwerte	220,35	218,391	904,915	614,915
Standardabweichung	± 39,5	± 19,5	±173	± 61,6

*Ein Experiment entspricht einer Kulturflasche mit 4 Embryonen; die angegebenen Werte für "R-Körper" sind Mittelwerte aus jeweils 4 Daten, die an einzelnen R-Körpern gewonnen wurden; die Daten für "Schwanz" ergeben sich durch Bestimmungen an jeweils 4 gepoolten Schwänzen.

**Präparationsmethode: DO siehe Tabelle 3, N siehe Tabelle 3

***R-Körper = Restkörper = Körper ohne Schwanz



Grafik 3: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine der Embryo-Teile Schwanz (S) und Restkörper (R) von Tag-11-Embryonen, die entweder nach der DO-▤ oder N-▭ Präparation unter Standardbedingungen inkubiert wurden.

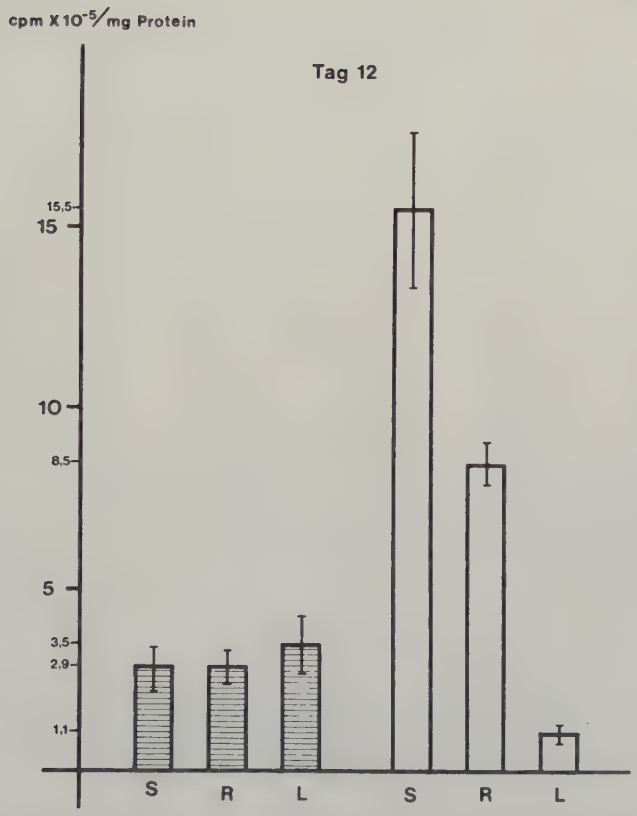
Tabelle 7: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-12-Embryo-Teilen nach unterschiedlicher Präparationsmethode (DO, N) kultiviert

Experimente*	cpm x 10^3/mg Protein					
	DO**			N**		
	Schwanz	Leber	R-Körper***	Schwanz	Leber	R-Körper
Exp. 1	225,22	303,47	257,15	1262,70	91,22	820,00
Exp. 2	353,94	454,09	372,62	1449,93	91,26	789,79
Exp. 3	275,42	254,04	240,57	1538,84	150,5	958,71
Exp. 4	232,34	337,49	303,46	1555,07	83,94	799,08
Exp. 5	331,02	454,31	342,16	1920,29	117,27	861,16
Exp. 6	226,07	259,64	234,90	1589,23	97,26	847,78
Exp. 7	353,97	386,94	287,58			
Gesamt-mittelwerte	285,43	350,00	291,21	1552,7	105,23	846,09
Standardab-weichung	± 59,9	± 84,4	± 52,1	± 215	± 24,9	± 61,6

*Für jedes Experiment wurden 2 Embryonen verwendet; die angegebenen Werte für "R-Körper" sind Mittelwerte aus 2 Daten, die jeweils an 2 einzelnen R-Körpern bestimmt wurden; die Daten für "Schwanz" und "Leber" ergeben sich durch Bestimmungen an jeweils 2 gepoolten Schwänzen bzw. Lebern.

**Präparationsmethode: DO siehe Tabelle 3, N siehe Tabelle 3

***R-Körper = Restkörper = Körper ohne Schwanz und ohne Leber



Grafik 4: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine der Embryo-Teile Schwanz (S), Restkörper (R) und Leber (L) von Tag-12-Embryonen nach Präparation (DO) ▤ oder (N) □ und Inkubation unter Standardbedingungen.

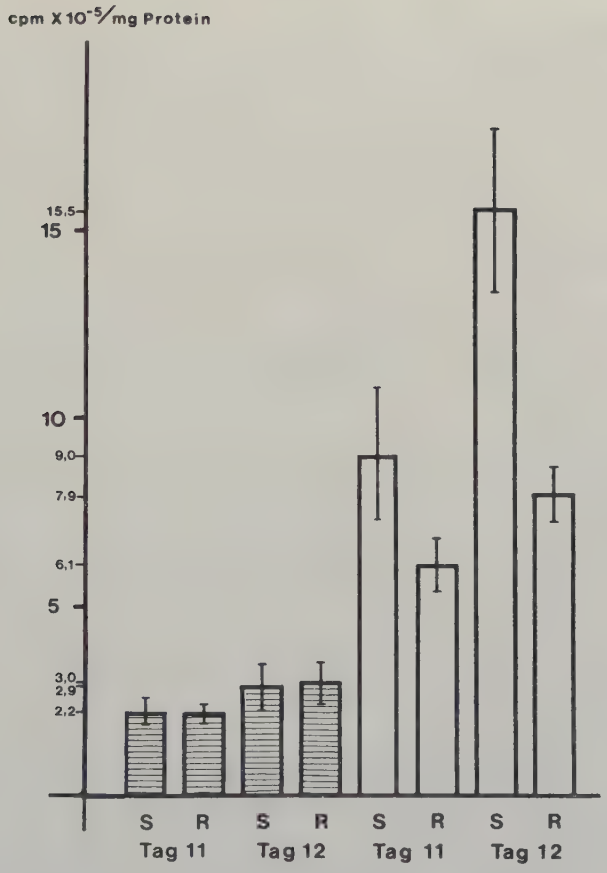
Tabelle 8: Errechneter Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von R-Körpern (hier R-Körper mit Leber) von Tag-12-Embryonen nach unterschiedlicher Präparationsmethode (DO, N) kultiviert

Experimente*	cpm x 10^3/mg Protein	
	DO**	N**
Exp. 1	260,88	780,67
Exp. 2	379,03	709,52
Exp. 3	241,44	918,25
Exp. 4	305,80	748,26
Exp. 5	350,37	812,80
Exp. 6	236,76	800,13
Exp. 7	295,72	
Gesamt-mittelwerte	295,71	794,94
Standardab-weichung	± 54,3	± 71,0

*Für jedes Experiment wurden 2 Embryonen verwendet; die angegebenen Werte sind nach folgender Methode aus den Grunddaten der Tabelle 7 errechnet worden:

$$\frac{\text{cpm Mittelwert Leber+cpm Einzelwert eines R-Körpers ohne Leber und ohne Schwan}}{\text{mg Protein Mittelwert Leber+ mg Protein Einzelwert eines R-Körpers ohne Leber und ohne Schwanz}}$$

**Präparationsmethode: DO siehe Tabelle 3, N siehe Tabelle 3



Grafik 5: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine der Embryo-Teile Schwanz (S) und Restkörper (R) bei Tag-11- und Tag-12-Embryonen nach Präparation (DO) ▤ oder (N) ▭ und anschließender Inkubation unter Standardbedingungen.

2.2.3. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in die Proteine von Mäuseembryonen der Tage 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung untersucht, die nach verschiedenen Präparationsmethoden (DO, DAO, N, NZ) aber weitgehend gleichen Inkubationsbedingungen kultiviert waren.

Wie bereits im ersten experimentellen Kapitel (2.1.) ausführlich beschrieben, überleben DO-präparierte Postimplantationsembryonen der Tage 10 und 11 eine 4-stündige Inkubation in 1 ml Tyrode-Lösung nahezu immer. Dies blieb auch bei Verwendung von 27 µCi/≙ 27 µl einer ^{3}H-markierten Aminosäuremischung (bestehend aus 15 essentiellen Aminosäuren) zum "Kulturmedium" unbeeinträchtigt. Tag-12-DO-Embryonen, die nur mit Tyrode-Lösung inkubiert zu 50% starben (siehe 2.1.2.1., Tabelle 1), zeigten mit den radioaktiven Aminosäuren im Medium ein deutlich verbessertes Überleben, indem nur etwa 30% der Embryonen tot waren, wenn auch die übrigen Embryonen alle Übergangsformen vom Normalzustand zum Absterben aufwiesen (Tabelle 3). Generell läßt sich sagen, daß die Verwendung von Radioaktivität in der beschriebenen Form zu keiner sichtbaren Beeinträchtigung oder gar Schädigung (morphologisch wie physiologisch) der untersuchten Embryonen führte. Dies bestätigte sich auch bei der Untersuchung der DAO-Embryonen. Zwar starben hier etwa 50% der inkubierten Tag-10-Embryonen bereits innerhalb der 4 Stunden Inkubationsdauer, das hatte jedoch rein mechanische Ursachen (siehe Ergebnisse 2.2.2.2.). Die in ihren Eihüllen verbliebenen DAO-Embryonen überlebten einwandfrei und zeigten dabei sogar einen deutlich größeren Einbau an Radioaktivität als die DO-Embryonen. Aufgrund der hohen Fehlerquote von eben 50% erwies sich diese Präparationsmethode (DAO) aber als so uneffektiv, daß sie keine weitere Verwendung fand.

Das Ziel dieser Arbeit war es ja festzustellen, mit welcher Präparationsmethode bei Postimplantationsembryonen (Tag 10, 11, 12) unter Kulturbedingungen der höchste Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine erreicht werden kann, wobei aber gleichzeitig der physiologische Zustand der Embryonen so gering wie möglich beeinträchtigt werden sollte. Die Ergebnisse zeigen, daß die Kultivierung von Nackten-Embryonen (N- oder NZ-Embryonen) zu einem wesentlich höheren Einbau führen als bei Embryonen (DO- oder DAO), bei denen Amnion, Dottersack und Placenta im wesentlichen erhalten blieben (siehe z.B. Tabelle 4, Grafik 1).

Embryonen ohne Eihüllen befinden sich während der Inkubationsdauer vollständig in dem sie umgebenden radioaktiven Medium (Kontaminationsfläche am größten). Durch ihre Haut hindurch, also rein durch Diffusionskräfte, gelangen die markierten Aminosäuren in ihre Körper und werden dort in ihre Proteine eingebaut. Embryonen mit Eihüllen dagegen sind nie bzw. bei Präparationsart -DAO- nur bedingt mit dem sie umgebenden Medium in direktem Hautkontakt (Kontaminationsfläche am niedrigsten). Innerhalb ihrer schützenden Eihüllen liegend und in erster Linie von ihrer Amnionflüssigkeit umgeben, gelangen deutlich weniger radioaktiv markierte Aminosäuren in ihre Körper als bei Nackten-Embryonen (siehe z.B. Grafik 2). Die embryonalen Hüllen stellen demnach eine große Barriere für die Diffusion der Aminosäuren dar, die selbst durch einen intakten Blutkreislauf nicht aufgehoben werden können.

Da Nackte-Embryonen die ^{3}H-markierten Aminosäuren nur durch Diffusion aufnehmen können, war jedoch zu erwarten, daß eine gleichmäßige Verteilung der ^{3}H-Aminosäuren zwischen äußeren und inneren Körperteilen der Embryonen nicht gegeben ist. Diese Annahme bestätigte sich an Tag-11- und Tag-12-Embryonen durch die Untersuchungen von Körperteilen (Schwanz (S) und

Restkörper (R) bei Tag-11-Embryonen; Schwanz (S), Restkörper (R) und Leber (L) bei Tag-12-Embryonen), die dem äußeren Medium unterschiedlich exponiert waren. Je weiter Körperteile bzw. Gewebe oder Organe von der Kontaminationsfläche (dem radioaktiven Medium bzw. der Hautoberfläche) entfernt waren, desto weniger Radioaktivität wurde eingebaut; das bedeutete auch, daß mit steigendem Alter und anwachsendem Volumen der Embryonen immer weniger in ihre inneren Gewebe und Organe inkorporiert wird. Eine Ausnahme bildeten Tag-10-N-Embryonen, die aufgrund ihrer geringen Körpergröße eine gleichmäßige Durchdringung mit ^{3}H-Aminosäuren anzeigten (kein Unterschied zwischen ganzen und in mehrere Teile zerschnittene N-Embryonen; siehe Grafik 1).

Während die Befunde bei N-Embryonen, d.h. hoher Einbau von radioaktiven Aminosäuren aber ungleiche Verteilung im Körper zu erwarten war, konnte das Verhalten der DO-Embryonen nicht ohne weiteres vorausgesagt werden. Die Frage war: Nehmen Embryonen mit intaktem Blutkreislauf die ^{3}H-markierten Aminosäuren im Medium tatsächlich über die Blutgefäße auf und verteilen sie gleichmäßig im Körper, oder erfolgt auch unter diesen Bedingungen die Aufnahme der ^{3}H-Aminosäuren zum weitaus größten Teil durch allgemeine Diffusion durch die embryonalen Hüllen hindurch bis in den Embryo hinein. Würde sich die letztere Möglichkeit als richtig erweisen, wäre für den späteren Zweck dieser Untersuchung, nämlich der fluorographischen Darstellung elektrophoretischer Proteinmuster, die Präparation von N-Embryonen der Präparation von DO-Embryonen unbedingt vorzuziehen, da N-Embryonen einen wesentlich höheren Einbau zeigen. Bei Kultivierung von Embryonen mit dem alleinigen Ziel, Aminosäuren in den Embryo zu transportieren, wäre es nicht notwendig, daß die physiologische Entwicklung des Embryos während der Inkubation fortschreitet. Demnach würde die wesentlich physiologischere Präparationsmethode der DO-Embryo-

nen keinen Vorteil bedeuten, wenn man annehmen kann, daß N-Embryonen während der relativ kurzen Inkubationszeit von 4 Stunden den physiologischen Zustand ihrer Zellen bewahren. Die Ergebnisse zeigen jedoch eindeutig, daß ein intakter Blutkreislauf der Embryonen für eine gleichmäßige Verteilung der Aminosäuren im ganzen Körper unbedingt notwendig ist (Grafik 3, 4, 5). Demnach erweist sich für die noch folgenden experimentellen Untersuchungen die Präparationsmethode, bei der das Amnion, der Dottersack und die Placenta des Embryos erhalten bleiben, als die beste Methode. Die Aufnahme radioaktiver Aminosäuren durch den Embryo ist unter diesen Bedingungen zwar vergleichsweise gering, die unterschiedlichen Proteine in den verschiedenen Geweben werden aber unter einer gleichen ^{3}H-Aminosäure-Konzentration synthetisiert. Die relative Konzentration der einzelnen Proteine im 2DE-Muster sollte bei dieser Inkubationsmethode den natürlichen Verhältnissen weitgehend entsprechen. Ferner sind die physiologischen Bedingungen für den Embryo bei dieser Präparationsmethode am besten gewährleistet.

KOCHAR (1975) inkubierte ebenfalls Mausembryonen , DO-präpariert nach COCKROFT (1973) am Tag 11 der Embryonalentwicklung (≙ Tag 10 nach der Gesamtsomitenzahl ≙ 30 Somiten) für 4 Stunden in einem radioaktiven Medium. Dabei erzielte er bei Verwendung eines Vollmediums mit markiertem L-Prolin (285 mCi/m mol Zugabe 1 µCi/ml) und der DO-Präparationsmethode einen etwa 5-fach höheren Einbau, als wenn er den Dottersack geschlossen ließ. Ebenfalls war der Einbau an Radioaktivität bzw. der gemessenen Proteinsyntheserate 5 x so hoch, wenn er Tyrode-Lösung statt eines Vollmediums nahm; allerdings war hierbei der Dottersack verschlossen. Eine Kombination von beiden Möglichkeiten, wie ich sie hier angewendet habe, d.h. DO-Präparation und Minimalmedium (Tyrode-Lösung) sollte dann

erst recht einen hohen Einbau an Radioaktivität erbringen. Das wurde von KOCHAR nicht untersucht.

Andere Untersuchungen einer radioaktiven Markierung in vitro bei vergleichbaren Altersstufen (z.B. PAYNE u. DEUCHAR, 1972; WILLIAMS et al., 1975b; MOORE et al., 1977; FREEMAN et al., 1981) zielten mehr auf Einbaustudien zwischen Embryo und seinen Eihüllen bzw. auf die Funktion des Dottersackes als solches ab, als auf den von mir erstrebten hohen Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen unter weitgehend physiologischen Bedingungen.

Eine zusätzliche Beobachtung bei diesen Untersuchungen war, daß bei einem Vergleich der drei untersuchten Entwicklungsstadien (Tag 10, 11, 12) unter den Bedingungen beider Präparationsmethoden (DO- und N-Embryonen) immer Tag-10-Embryonen wesentlich mehr radioaktive Aminosäuren im Verhältnis zu ihrer Proteinmenge aufnehmen als Tag-11- oder Tag-12-Embryonen (siehe Grafik 2). Nach dem Abfall des Einbaues nach Tag 10 steigt er jedoch bei beiden Präparationsmethoden von Tag 11 zu Tag 12 wieder an (Grafik 2). Die Interpretation dieses Ergebnisses ist sehr vielfältig. Sowohl die durchschnittlich gemessene Gesamtproteinmenge eines Embryos als auch dessen durchschnittliche Radioaktivität steigt innerhalb der untersuchten Stadien an (Proteinmenge von Tag 10 zu Tag 12 um das 5,6-fache; die aufgenommene Radioaktivitätsmenge in demselben Zeitraum um das 3,3-fache). Da die "Säulen" in allen Grafiken aber die "Quotienten" wiederspiegeln, die ein Ausdruck der tatsächlich eingebauten Radioaktivität pro mg Proteinmenge (pro Embryo) darstellen, muß am Tag 10 eine erhöhte Stoffwechselaktivität bzw. ein kürzerer Zellteilungszyklus für eine vergleichsweise große Anzahl von Zellen dieses Tages angenommen werden. Gerade die Extremi-

täten (vordere und hintere Gliedmaße und vor allem der Schwanz) werden an diesem Entwicklungstag 10 verstärkt angelegt und ausgebildet (THEILER, 1972). Hinzu kommt noch eine weitere morphologische Veränderung am Tag 10 der Maus. Die Epidermis eines Tag-10-Embryos ist zu Beginn noch an vielen Stellen einschichtig, wird aber im Laufe des 10. Entwicklungstages immer mehr zweischichtig und verändert dabei seine Struktur und Funktion. Diese dann erste Epidermalschicht, "Periderm" genannt, wird immer undurchlässiger und schützt so den Embryo vor einem Aufschwemmen bzw. Aufquellen durch die Amnionflüssigkeit. Zwangsläufig wird dadurch auch die Aufnahmefähigkeit bzw. die Permeabilität von Stoffen betroffen werden, die sonst leicht durchdiffundieren.

Diese morphologische Gegebenheit erklärt nun zusätzlich zu dem Fehlen eines intakten Blutkreislaufs auch, warum N-Embryonen mit steigendem Alter und wachsendem Volumen wie an Tag 11 und Tag 12 immer weniger Radioaktivität in ihre inneren Zellschichten (bzw. dünneren) und Organe einbauen. Die Zunahme im Einbau markierter Aminosäuren in die Proteine der Embryonen von Tag 11 zu Tag 12 würde dann allein auf die sehr große Oberflächenvergrößerung durch Volumenzunahme der Embryonen zu erklären sein. Außerdem ist es dann auch verständlich, daß nach dem vollständigen Ausbilden mehrerer Epidermalschichten die Diffusion von Stoffen nicht mehr als Ernährungssystem gelten kann und somit zwangsläufig ein funktionsfähiger Placenta-Embryo-Blutkreislauf diese Funktion übernehmen muß, der dann auch die gleichmäßige Verteilung (Versorgung) der radioaktiv markierten Aminosäuren (Nährstoffe) sicherstellen sollte.

Die Tatsache, daß Tag-10-Embryonen der Maus unter den hier angewandten Versuchsbedingungen immer wesentlich mehr radioaktive Aminosäuren aufnehmen als Tag-11- und Tag-12-Embryonen, ist durchaus mit einer ganzen Untersuchungsserie von GOEDBLOED

(1972, 1976, 1977) in Einklang zu bringen. Er fand unter anderem, daß am Tag 10 der Embryonalentwicklung der Maus (bei ihm als Tag 11 bezeichnet, weil er das Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gleich Tag 1 setzte) ein Bruch in der "Wachstumskurve" stattfindet. Das bedeutete bei ihm, daß bis zum Tag 10 einschließlich ein sehr steiles Wachstum linear stattfindet, um dann "...abrupt abgebrochen...aus diesem Bruchbereich" weniger steil als vorher weiter anzusteigen. Dies wäre vielleicht mit den geschilderten Verhältnissen im Einbau der Radioaktivität der Tage 10 zu den Tagen 11 und 12 gleichzusetzen.

2.2.4. Schlußfolgerungen

Der Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Postimplantationsembryonen (Tag 10, 11, 12) zeigt:

1) Keine äußerliche Schädigung der kultivierten Embryonen durch die verwendete Radioaktivität;
2) Nackte-Embryonen (N- oder NZ-Embryonen) bauen immer mehr Radioaktivität ein als Embryonen mit Eihüllen (DO- bzw. DAO-Embryonen);
3) Tag-10-Embryonen zeigen immer unter allen Präparationsbedingungen im Vergleich zu Tag-11- und Tag-12-Embryonen den höchsten Einbau an radioaktiven Aminosäuren in ihre Proteine an;
4) Der intakte Blutkreislauf bei DO-Embryonen sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der aufgenommenen markierten Aminosäuren im Embryo. Die Aufnahme von Aminosäuren durch Diffusion spielt bei den DO-Embryonen keine Rolle. Bei N-Embryonen erfolgt die Aufnahme der radioaktiven Aminosäuren nur durch Diffusion. Hier werden die Proteine im peripheren Körperbereich stärker markiert als im Inneren. Das gilt allerdings nur für Embryonen, die älter als Tag 10 sind.

Für die hier angestrebten Untersuchungen erwiesen sich demnach die DO-Embryonen am geeignetsten. Ihr Nachteil, die relativ langsame Aufnahme der radioaktiven Aminosäuren (Vergleich zu N-Embryonen), könnte durch eine entsprechend lange Inkubationszeit und durch erhöhte Konzentration an radioaktiver Substanz kompensiert werden. Dafür muß jedoch geklärt werden, wie stark ein normales Leben der Embryonen in Kultur von der Inkubationszeit und der radioaktiven Dosis abhängen. Diese Frage wurde untersucht und ist Gegenstand des folgenden Kapitels.

2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen in Abhängigkeit von der Konzentration des Isotops und der Inkubationsdauer

2.3.1. Material und Methoden

2.3.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden,wie unter 2.1.1.1. beschrieben,nur NMRI-Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität.

In dieser Untersuchung über den Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine der Embryonen in Abhängigkeit von der Konzentration des Isotops und der Inkubationsdauer wurden Postimplantationsembryonen der Tage 10, 11 und bedingt auch Tag 12 der Embryonalentwicklung berücksichtigt.

2.3.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente eine balancierte Tyrode-Lösung, wie sie in Kapitel 2.1.1.2. ausführlich dargestellt wurde.

Das Kulturmedium wurde aus 1 ml dieser Tyrode-Lösung und dem Zusatz von ^{3}H-markierten Aminosäuren (siehe ebenfalls 2.1.1.2.) gebildet. Die Menge an zugegebener Radioaktivität betrug in chronologischer Reihenfolge der Versuche: (A) 27 µl/≙ 27 µCi, (B) 20 - 300 µl/≙ 20 - 300 µCi, (C) 150 µl/≙ 150 µCi.

2.3.1.3. Präparationsmethode

Als Präparationsmethode wurde hier für alle Untersuchungstage die unter 2.1.1.3. geschilderte DO-Präparation angewandt. Einzige Ausnahme bildete der Tag 10, für den noch zusätzlich N-Embryonen in der Inkubationszeitabhängigen-Untersuchung (A) benötigt wurden.

2.3.1.4. Inkubationsmethode

Normalerweise wurden vier Embryonen einer Maus nach der Präparation (s.o.) in einer Bördelflasche mit 1 ml Tyrode-Lösung + einer bestimmten Menge ((A), (B) oder (C), siehe 2.3.1.2.) an ^{3}H-markierten Aminosäuren verschlossen, begast und in einem Brutschrank mit Rotor für (A) 2 - 16 Stunden, (B) 4 Stunden oder (C) 4 - 16 Stunden inkubiert. Eine Ausnahme bildeten Tag-12-Embryonen, bei denen zwar ebenfalls vier Embryonen einer Maus präpariert wurden, die aber dann jeder für sich allein inkubiert wurden. Die hier nur in wesentlichen Teilen erwähnte Inkubationsmethode entspricht im einzelnen der unter 2.1.1.4. beschriebenen Methode.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Inkubationsmethode für alle Untersuchungen ((A), (B) und (C)) im Prinzip identisch ist. Nur die Konzentration an ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium bzw. die Inkubationszeit wurden im einzelnen verändert:

Versuchsreihe (A): Konzentration konstant, Inkubationszeit variabel;

Versuchsreihe (B): Konzentration variabel, Inkubationszeit konstant;
Versuchsreihe (C): Konzentration "hoch" und konstant, Inkubationszeit variabel.

2.3.1.5. Auswertungsmethode

Jeder Embryo der Untersuchungstage 10, 11 und 12 wurde einzeln auf seinen Zustand nach der Inkubation beurteilt (siehe 2.1.1.5.). Zur Aufarbeitung (siehe 2.1.1.6.) und damit zur Berechnung des radioaktiven Einbaues der markierten Aminosäuren in die Proteine pro inkubierten Embryo wurden alle N-Embryonen und diejenigen DO-Embryonen verwendet, die die Kultivierung einwandfrei überlebten. DO-Embryonen, die eine Beeinträchtigung ihres Zustandes aufwiesen, wurden - soweit für eine Gesamtbeurteilung nötig - ebenfalls aufgearbeitet und ausgewertet. Ihre Daten wurden dann allerdings in den Tabellen in Klammern (...) gesetzt. Als tot angesehene DO-Embryonen wurden nicht ausgewertet.

2.3.2. Ergebnisse

In dieser Untersuchung wurden Mausembryonen der Entwicklungstage 10, 11 und 12 nach der DO-Präparation in verschiedenen Versuchsreihen auf den Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in ihre Proteine untersucht. Hierbei beinhalteten die Versuchsreihen folgendes:
Versuchsreihe (A): Tag-10-DO-Embryonen und hier als Ausnahme noch zusätzlich Tag-10-N-Embryonen wurden in einem Kulturmedium aus 1 ml Tyrode-Lösung + 27 µl/≙ 27 µCi ^{3}H-markierter Aminosäuren (^{3}H-AS) für 2 - 16 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert.
Versuchsreihe (B): Tag-10-,11-,12-DO-Embryonen wurden für 4 Stunden in Abhängigkeit von der ^{3}H-AS-Konzentration (20 - 300 µl/≙ 20 - 300 µCi ^{3}H-AS-Zugabe zu 1 ml Tyrode-Lösung) im Kulturmedium unter ansonsten Standardbedingungen inkubiert.

Versuchsreihe (C): Tag-10- und -11-DO-Embryonen wurden in einem Kulturmedium aus 1 ml Tyrode-Lösung + 150 µl/≙ 150 µCi ^{3}H-AS für 4 - 16 Stunden unter ebenfalls Standardbedingungen inkubiert.

2.3.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Versuch (A) (Tabelle 9): Tag-10-DO-Embryonen überleben in Kultur bis zu 10 Stunden fast immer ausgezeichnet, ebenso wie etwa 75% der 12 Stunden inkubierten Embryonen. Allerdings treten hier dann erstmals auch deutlich vermindert lebensfähige Embryonen auf, ohne daß diese die anderen Embryonen der gleichen Kulturflasche sichtbar beeinflussen oder das Kulturmedium irgendwie verändert erscheint. Nach 14 Stunden in Kultur hat sich der bereits bei 12 Stunden allerdings nur angedeutete negative Trend so verstärkt, daß alle Embryonen eine verminderte Herzleistung zeigen und die Durchblutung wesentlich geschwächt ist. Das Blut selbst fließt nur noch zähflüssig im Körper und ist im Dottersack völlig zum Erliegen gekommen. Das Kulturmedium ist leicht gelblich (Zeichen für einen pH-Umschlag ins "saure Milieu"), trüb und stinkt. Länger inkubierte Embryonen sind tot.

Tag-10-N-Embryonen zeigen bis zu 6-stündiger Kultivierung ein für diese Präparationsmethode als "normal" bezeichnetes Aussehen, d.h. relativ guter Herzschlag bei stark verminderter bzw. nicht vorhandener Durchblutung (siehe 2.2.1.5.), Medium klar. Nach nur zwei Stunden in Kultur zeigen noch knapp 88% aller N-Embryonen eine gewisse Körperdurchblutung, während bereits nach 4 Stunden dies nur noch bei etwa 17% der N-Embryonen zu beobachten ist. Darüber hinaus ist bei keinem N-Embryo irgendeine Durchblutung festzustellen. Nach 8 Stunden Inkubation beginnt eine langsame Eintrübung des Mediums bei scheinbarem unveränderten Äußeren der Embryonen; der Herzschlag läßt aber bei 1/3 aller Inkubierten noch mehr nach (Herzschlag (+))als er ohnehin schon ist (Herzschlag (++)). Dieser negative Trend setzt sich bei 10 Stunden in

Kultur fort, indem bereits 50% der untersuchten Embryonen nur noch einen schwachen Herzschlag aufweisen und auch äußerlich deutlich angegriffen erscheinen. Das Medium stinkt in allen Kulturflaschen und zeigt eine verstärkte Eintrübung. Größtenteils sind auch alle Embryonen fast vollständig undurchsichtig geworden, was ein deutliches Zeichen für Gewebeveränderungen ist. Bei Fortdauer der Inkubation gehen die Gewebeveränderungen soweit, daß von 24 inkubierten N-Embryonen 2 Embryonen nicht mehr aufgearbeitet und ausgewertet werden konnten (siehe Tabelle 13).

Versuch (B) (Tabelle 10): Alle Tag-10-DO-Embryonen zeigen sowohl morphologisch wie physiologisch innerhalb der 4 Stunden Inkubation mit steigender Konzentration an ^{3}H-markierten Aminosäuren im Medium ein einwandfreies Überleben. Bei Tag-11-DO-Embryonen ist dies nur uneingeschränkt bis zu einer Zugabe von 100 µCi an ^{3}H-AS-Mix ins Kulturmedium der Fall, wobei allerdings immerhin noch fast 69% der bei Zugabe von 160 µCi ^{3}H-AS-Mix inkubierten Embryonen das gleiche aufweisen können. Die übrigen 31% der Embryonen dieser Konzentrationsstufe überleben zwar ebenfalls, jedoch ist vor allem deren Durchblutung sehr deutlich beeinträchtigt. Dieser negative Trend setzt sich soweit fort, daß bei 200 µCi Zugabe an markierten Aminosäuren nur noch 1/3 aller Embryonen einwandfrei überlebt, während die übrigen keinerlei Durchblutung mehr aufweisen und meistens auch keinen Herzschlag mehr anzeigen, sie sind praktisch tot.

Tag-12-DO-Embryonen zeigen bis auf einen einzigen Embryo, der einwandfrei bei einer Zugabe von 100 µCi zum Kulturmedium überlebte, bei keiner Konzentrationsstufe ein Überleben in vitro an. Obwohl einzeln inkubiert und somit unbeeinflußt von etwaigen anderen Embryonen sind sie faktisch tot, ohne Auflösungserscheinungen zu zeigen; das Kulturmedium ist ungetrübt klar; einzig das Blut ist überall dunkelrot gefärbt wie stark venöses Blut.

Versuch (C) (Tabelle 11): Tag-10-DO-Embryonen zeigen bis 10 Stunden in vitro ein unverändert einwandfreies Überleben. Erst bei 12 Stunden in Kultur tritt eine beginnende Degradation in den Überlebenskriterien in Form von leichten Blutgerinnseln ein, die bei einigen Embryonen schon recht massiv auftreten und zu stärkeren Durchblutungsstörungen führen. Diese verstärken sich bei 14 Stunden in Kultur dermaßen, daß man hier bereits von einem Absterben der Embryonen reden kann; sehr viele Blutgerinnsel überall, dadurch kaum eine Durchblutung, das Körpergewebe wirkt an einigen Stellen verändert, nur noch der Herzschlag ist einigermaßen vorhanden. Nach 16-stündiger Kultivierung sind sowohl das Medium verbraucht und eingetrübt als auch die Embryonen äußerlich stark angegriffen und das Körpergewebe so "verwachsen", daß man nur noch mit Mühe Somiten voneinander unterscheiden kann, geschweige denn zählen. Trotz eines gewissen Herzschlags bei einigen Embryonen sind alle so lang inkubierten Embryonen als tot anzusehen.

Tag-11-DO-Embryonen überleben bis einschließlich 6 Stunden weitgehend normal. Erst bei 8-stündiger in vitro-Behandlung sind häufig Embryonen ohne Durchlbutung (55%) und ohne Herzschlag (25%) zu beobachten. Nur knapp die Hälfte aller Inkubierten überlebte in dieser Phase einwandfrei. Bei noch längerer Kultivierung sind alle Embryonen tot und zeigen die üblichen Veränderungen in Körpergewebe, Konsistens und Medium.

Für alle drei hier durchgeführten Untersuchungen ((A), (B) und (C)) läßt sich außer den bisher beschriebenen Überlebenszuständen noch folgendes über eine mögliche Weiterentwicklung der inkubierten Embryonen (gemessen an der Schwanzsomitenzunahme) aussagen:

1) Alle untersuchten Tag-10-N-Embryonen zeigen keine Weiterentwicklung bzw. Zunahme der Schwanzsomiten.

2) Alle DO-Embryonen zeigen erst ab 6 Stunden in Kultur eine eindeutige Zunahme der Schwanzsomitenzahl um durchschnittlich 2 Somiten unabhängig vom Alter (Tag-10- oder Tag-11-Embryonen) oder der Menge an zugegebener Radioaktivität. Diese Aussage wurde

aufgrund der Einzelversuche (≙ pro Kulturflasche) ermittelt, d.h. die Somiten der inkubierten Embryonen einer Maus (in der Regel 4 Embryonen) wurden mit den Somiten der nicht inkubierten Embryonen derselben Maus verglichen. Bei längerer Inkubation steigt auch die Schwanzsomiten- und damit die Gesamtsomitenzahl.

2.3.2.2. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (A)

Tag-10-Embryonen wurden nach der Präparation (DO oder N) in ein Kulturmedium, bestehend aus 1 ml Tyrode-Lösung + 27 µl/ ≙ 27 µCi einer ^{3}H-markierten Aminosäuremischung (^{3}H-AS-Mix) für 2 bis 16 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert und der Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren bestimmt.

Tag-10-DO-Embryonen zeigen hierbei nach einem weitgehend kontinuierlichen Einbau an Radioaktivität bei 10 Stunden in vitro ein Maximum, daß auch bei längerer Inkubationszeit nicht mehr überschritten wird, sondern eher gleichbleibend anhält, so lange überlebende Embryonen vorhanden sind (Tabelle 12, Grafik 6).

Nackte-Tag-10-Embryonen bauen mindestens dreimal, meist sogar viermal so viel markierte Aminosäuren in ihre Proteine ein als DO-Embryonen bei gleicher Inkubationszeit. Ebenfalls steigt bei ihnen der Einbau an Radioaktivität mit der Zeit deutlich an und erreicht unter Berücksichtigung aller Werte bei 10 Stunden Kulturdauer ein gleichbleibendes Maximum (Tabelle 13, Grafik 6).

Tabelle 9: Zustand der Tag-10-DO- und -N-Embryonen bei gleicher ^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium, aber ansteigender Inkubationszeit

			Qualifizierung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation**									
Präp.-Methode	Inkubationsdauer in St.	Anzahl der Embryonen	Herzschlag -	+	++	+++	Durchblutung -	+	++	+++	Schwanzsomiten	Besonderheiten
DO*	2	8	0	0	1	7	0	0	1	7	1 - 5	-
DO	4	4	0	0	0	4	0	0	0	4	5 - 8	-
DO	6	12	0	0	1	11	0	0	1	11	1 - 8	-
DO	8	12	0	0	2	10	0	0	2	10	2 - 8	-
DO	10	12	0	0	0	12	0	0	0	12	3 - 9	-
DO	12	8	0	0	2	6	0	2	0	6	6 - 9	-
DO	14	4	0	0	4	0	0	4	0	0	7 - 10	Text
DO	16	8	5	3	0	0	8	0	0	0	8 - 12	Text
N*	2	8	0	0	8	0	1	7	0	0	1 - 5	Text
N	4	12	0	0	12	0	10	2	0	0	0 - 7	-
N	6	16	0	0	16	0	16	0	0	0	0 - 4	-
N	8	12	0	4	8	0	12	0	0	0	2 - 7	-
N	10	12	0	6	6	0	12	0	0	0	0 - 5	Text
N	12	24	0	4	20	0	24	0	0	0	0 - 3	Text

*Siehe Tabelle 3

**Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien

Tabelle 10: Zustand der Tag-10-, Tag-11- und Tag-12-DO-Embryonen nach 4 Stunden Inkubation bei ansteigender ^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium

Präp.-tag	^{3}H-Aminos.-konz. in µCi	Anzahl der Embryonen	Herzschlag				Durchblutung				Schwanzsomiten	Besonderheiten
			-	+	++	+++	-	+	++	+++		
10	20	8	0	0	0	8	0	0	0	8	2 - 7	-
10	30	4	0	0	0	4	0	0	0	4	5 - 8	-
10	40	12	0	0	0	12	0	0	0	12	1 - 6	-
10	60	8	0	0	0	8	0	0	0	8	4 - 7	-
10	80	8	0	0	0	8	0	0	0	8	7 - 10	-
10	120	12	0	0	0	12	0	0	0	12	1 - 7	-
10	160	20	0	0	0	20	0	0	0	20	1 - 7	-
10	200	8	0	0	0	8	0	0	0	8	1 - 7	-
10	240	12	0	0	0	12	0	0	0	12	1 - 6	-
10	300	8	0	0	0	8	0	0	0	8	1 - 6	-
11	40	8	0	0	0	8	0	0	0	8	9 - 14	-
11	100	8	0	0	0	8	0	0	1	7	11 - 14	-
11	160	16	0	4	1	11	0	4	1	11	9 - 15	Text
11	200	16	6	3	1	6	10	0	1	5	9 - 16	Text
12	40	4	3	1	0	0	4	0	0	0	19 - 24	Text
12	100	4	3	0	0	1	3	0	0	1	19 - 25	Text
12	160	4	3	1	0	0	4	0	0	0	22 - 25	-
12	200	4	3	1	0	0	4	0	0	0	19 - 25	-
12	250	8	8	0	0	0	8	0	0	0	22 - 24	-

Tag-10- und Tag-11-Embryonen wurden wie üblich nach dem Modus: 4 Embryonen einer Maus pro Flasche inkubiert; bei Tag-12-Embryonen wurden zwar ebenfalls 4 Embryonen einer Maus präpariert, aber jeder einzeln inkubiert.

*Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien.

Tabelle 11: Zustand der Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen nach Inkubation in einem hoch radioaktivem Medium (150 µCi ^{3}H-Aminosäuren + 1 ml Tyrode-Lösung) bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

Präp.-tag	Inkubationsdauer in St.	Anzahl der Embryonen	Qualifizierung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation*									
			Herzschlag				Durchblutung				Schwanzsomiten	Besonderheiten
			-	+	++	+++	-	+	++	+++		
10	4	8	0	0	0	8	0	0	0	8	1 - 5	-
10	6	8	0	0	0	8	0	0	0	8	1 - 8	-
10	8	8	0	0	0	8	0	0	0	8	0 - 8	-
10	10	8	0	0	1	7	0	0	1	7	3 - 8	-
10	12	8	0	0	1	7	0	3	5	0	3 - 7	Text
10	14	8	0	2	6	0	4	4	0	0	5 - 8	Text
10	16	8	3	1	4	0	8	0	0	0	3 - 9	Text
11	4	8	0	0	4	4	0	1	3	4	12 - 14	Text
11	6	8	0	1	0	7	0	1	0	7	12 - 14	-
11	8	20	5	6	0	9	11	0	1	8	10 - 17	Text
11	10	8	4	4	0	0	7	1	0	0	15 - 17	Text

*Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien

Tabelle 12: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-DO-Embryonen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

cpm x 10^{3}/mg Protein

Unters. Embryonen	2 Std.*	4 Std.	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.	14 Std.
Embryo 1	351,63	400,55	575,51	784,99	892,66	662,16	(1059,12)
Embryo 2	258,32	423,41	491,66	732,48	447,99	917,77	(452,97)
Embryo 3	258,50	485,97	429,73	366,48	948,47	835,89	(771,18)
Embryo 4	299,15	436,78	542,86	916,38	735,80	720,04	(479,07)
Embryo 5	205,04		345,07	751,29	663,21	551,98	
Embryo 6	182,49		596,78	495,75	922,98	672,99	
Embryo 7	180,20		377,99	721,86	892,24		
Embryo 8			472,43	582,45	824,90		
Embryo 9			454,42	436,76	411,56		
Embryo 10			572,17	584,53	1044,10		
Embryo 11			368,96		824,48		
Embryo 12					458,26		
Mittelwerte	247,90	436,68	475,23	637,30	755,55	726,80	(690,59)
Standardabw.	± 63,6	± 36,1	± 89,0	±173	±214	±131	(±285)

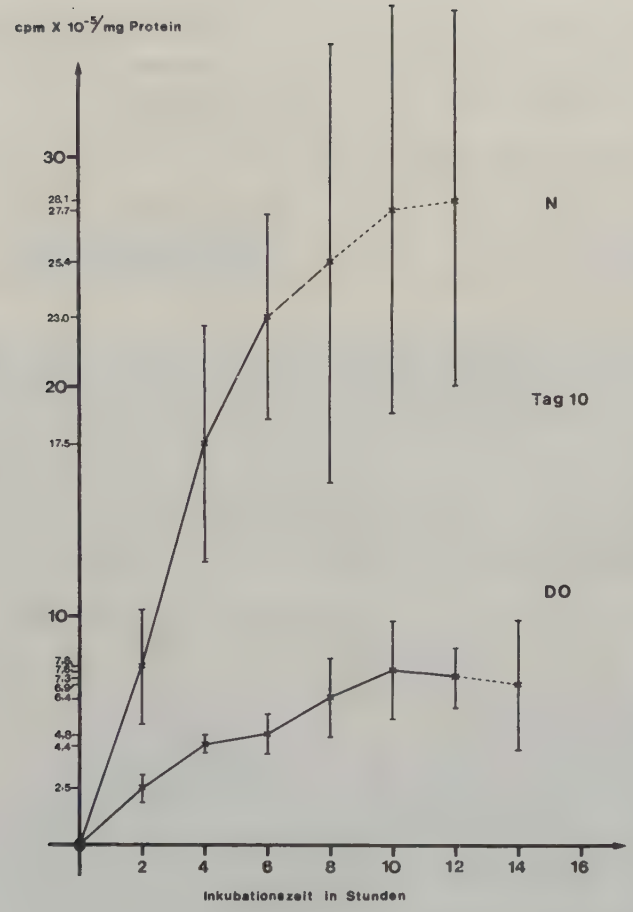
*Inkubationsdauer in Stunden (Std.)

Tabelle 13: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-N-Embryonen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer

cpm x 10^3/mg Protein

Unters. Embryonen	2 Std.*	4 Std.	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.
Embryo 1	645,11	2596,73	2685,09	3060,75	3907,96	2494,72
Embryo 2	786,53	1601,71	1889,51	2030,69	3856,06	3968,27
Embryo 3	1172,51	2604,05	2219,73	1186,94	2179,69	4097,61
Embryo 4	573,73	2518,81	2030,61	2305,99	2424,22	3501,41
Embryo 5	650,93	1415,18	1929,00	3550,10	1533,11	3831,40
Embryo 6	1149,63	1304,44	2661,13	3694,99	1778,16	4668,56
Embryo 7	533,26	1499,93	1936,94	2873,34	1513,80	2808,74
Embryo 8	708,82	1373,03	2118,46	3104,28	3927,21	2298,44
Embryo 9		1624,66	3374,49	962,74	2695,90	2120,58
Embryo 10		1633,72	2901,10	3334,45	3102,84	1934,98
Embryo 11		1216,98	2309,77	1266,16	3451,66	1894,27
Embryo 12		1588,56	1751,04	3116,08	2910,53	2437,98
Embryo 13			2320,11			2949,35
Embryo 14			1743,24			3278,61
Embryo 15			2366,91			1599,62
Embryo 16			2529,71			1671,38
Embryo 17						2559,47
Embryo 18						3451,26
Embryo 19						2781,41
Embryo 20						2153,94
Embryo 21						2479,04
Embryo 22						2927,25
Mittelwerte	777,57	1748,2	2297,9	2540,5	2773,4	2814,01
Standardabw.	± 249	± 515	± 448	± 966	± 903	± 814

*Inkubationsdauer in Stunden (Std.)



Grafik 6: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-Embryonen nach verschiedener Präparation (DO ≙ Dottersack offen; N ≙ Nackt) und Kultivierung in einem radioaktiven Medium (1 ml Tyrode + 27 µCi/27 µl ^{3}H-AS-Mix) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten.

2.3.2.3. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen in Abhängigkeit von der ^{3}H-Aminosäurekonzentration (B)

DO-Embryonen der Tage 10, 11 und 12 wurden für 4 Stunden in einem Kulturmedium, bestehend aus 1 ml Tyrode-Lösung + einer unterschiedlichen Menge (20 - 300 µl/≙ 20 - 300 µCi) der ^{3}H-markierten Aminosäuremischung unter Standardbedingungen inkubiert und der Einbau an Radioaktivität in ihre Proteine bestimmt.

Tag-10-DO-Embryonen zeigen dabei eine stetig ansteigende Tendenz im Einbau der ^{3}H-markierten Aminosäuren, die bei einer Zugabe von 160 µCi an Radioaktivität sprunghaft ein Maximum erreicht, das im Mittel so gut wie von keinem nachfolgenden Wert übertroffen wird. Überhaupt entsprechen die Ergebnisse für Tag-10-DO-Embryonen bei jeder Konzentrationsstufe durchschnittlich dem Doppelten von Tag-11-DO-Embryonen (Tabelle 14 und 15, Grafik 7).

Tag-11-DO-Embryonen zeigen ebenfalls einen stetigen Anstieg mit jeder Konzentrationserhöhung bis zu einer Zugabe von 160 µCi an ^{3}H-AS-Mix zu 1 ml Tyrode-Lösung. Danach ist nur noch ein sehr geringer und nur durch einen Wert begründeter Anstieg im Einbau festzustellen, so daß man davon ausgehen kann, daß wahrscheinlich sowohl für Tag-10-DO- als auch Tag-11-DO-Embryonen ein maximaler Einbau an Radioaktivität bei einer Zugabe von 160 µCi ^{3}H-AS-Mix erfolgt (siehe Tabelle 15, Grafik 7).

Vermindert überlebende Tag-11-DO-Embryonen zeigen bei jeder Konzentrationsstufe auch einen deutlich erniedrigten Einbau an Radioaktivität. Dieser geringere Einbau liegt dabei immer auch unterhalb der Schwankungsbreite der jeweilig untersuchten Konzentrationsmenge (Tabelle 15, Werte in Klammern).

Tag-12-DO-Embryonen überlebten keine der hier angebotenen Mengen an Radioaktivität im Kulturmedium; mit Ausnahme eines Embryos bei einer Zugabe von 100 µCi (Tabelle 10). Dieser einzige überlebende Tag-12-DO-Embryo zeigt dabei einen Einbau an Radioaktivität (877,29 x 10^{3} cpm/mg Protein), wie er in etwa auch (im Schwankungsbereich) für Tag-11-DO-Embryonen der gleichen Konzentration

Tabelle 14: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-DO-Embryonen nach 4 Stunden Inkubation in Abhängigkeit von der ^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium (≙ Zugabe von ^{3}H-Aminosäuren zu 1 ml Tyrode-Lösung)

cpm x 10^{3}/mg Protein

Unters. Embryonen	20 µCi/ml*	30 µCi/ml	40 µCi/ml	60 µCi/ml	80 µCi/ml	120 µCi/ml	160 µCi/ml	200 µCi/ml	240 µCi/ml	300 µCi/ml
Embryo 1	293,11	560,79	546,48	792,63	1403,07	1936,17	4281,65	2658,12	2981,21	3318,93
Embryo 2	290,37	499,62	470,46	962,47	743,21	1899,32	2893,84	3605,66	2463,35	3441,86
Embryo 3	287,20	504,44	609,99	654,04	1300,25	1170,95	4249,63	2251,65	3004,80	3626,25
Embryo 4	268,00	433,64	600,68	1129,82	661,08	2057,46	4795,80	1936,04	5698,02	3623.18
Embryo 5	255,14		676,01	659,16	994,93	1601,30	2251,65	2201,37	4818,34	2396,13
Embryo 6	193,45		865,50	930,41	773,72	1114,24	2657,96	3670,13	2665,59	2786,44
Embryo 7	191,17		499,42	749,05	1103,92	1186,84	3080,94	2482,03	3126,14	3554,14
Embryo 8	226,94		967,18	838,24	1138,98	1078,83	4143,55	6069,10	2400,72	2842,40
Embryo 9			808,36			1823,05	2743,48		2885,83	
Embryo 10			528,89			1631,86	2457,78		2310,50	
Embryo 11			613,25			1929,49	4867,59		3111,70	
Embryo 12			488,02			1561,72	2673,88		2271,56	
Embryo 13							3234,54			
Embryo 14							3165,55			
Embryo 15							2617,00			
Embryo 16							2445,22			
Embryo 17							2611,37			
Embryo 18							2356,12			
Embryo 19							2942,07			
Embryo 20							3264,21			
Mittelwerte	250,67	499,62	639,53	839,48	1014,9	1582,6	3186,7	3109,3	3144,8	3198,6
Standardabw.	± 42,1	± 52,0	±161	±163	± 271	± 361	± 823	±1355	±1051	± 463

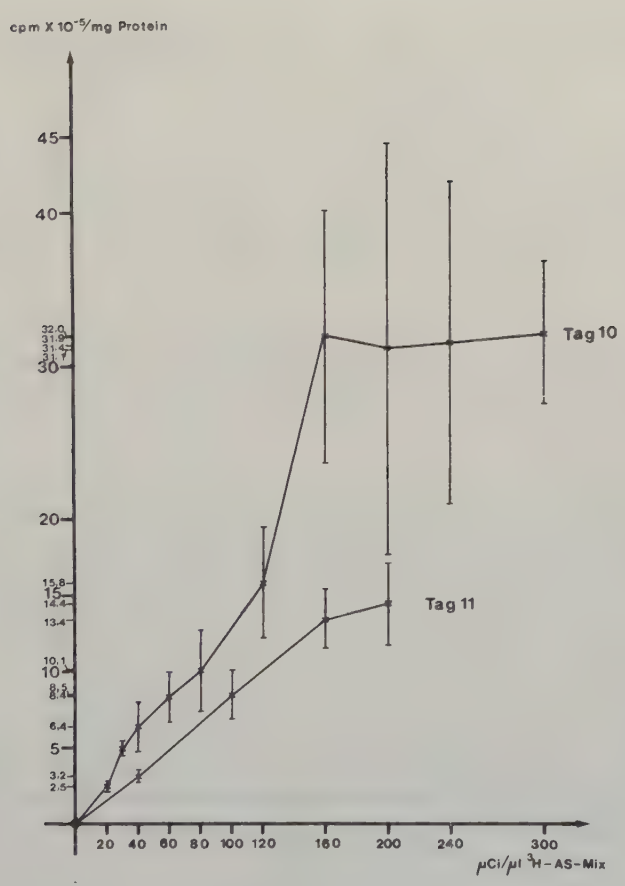
*^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium

Tabelle 15: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-11-DO-Embryonen nach 4 Stunden Inkubation in Abhängigkeit von der ^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium (≙ Zugabe von ^{3}H-Aminosäuren zu 1 ml Tyrode-Lösung)

cpm x 10^{3}/mg Protein

Unters. Embryonen	40 µCi/ml*	100 µCi/ml	160 µCi/ml	200 µCi/ml
Embryo 1	324,68	1083,93 (570,59)	1583,53 (732,95)	1317,55 (969,73)
Embryo 2	285,29	854,77	1523,55 (534,38)	1485,14
Embryo 3	319,17	923,59	1332,88 (548,82)	1108,86
Embryo 4	329,80	994,46	1533,64 (402,32)	1472,06
Embryo 5	417,63	691,68	1375,11 (999,05)	1829,73
Embryo 6	339,97	811,28	1598,68	
Embryo 7	275,58	620,897	1224,79	
Embryo 8	306,39		1186,64	
Embryo 9			1247,76	
Embryo 10			1081,93	
Embryo 11			1077,44	
Mittelwerte	324,81	854,37	1342,4	1442,7
Standardabweichung	± 43,5	± 163	± 195	± 264

*^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium



Grafik 7: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen nach 4 Stunden Inkubation in Abhängigkeit von der ^{3}H-Aminosäurekonzentration im Kulturmedium.

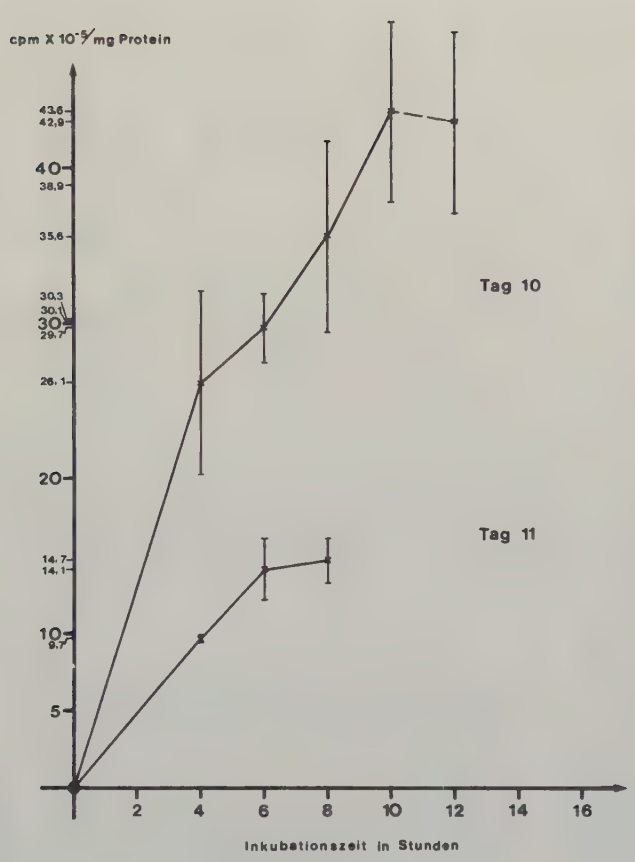
2.3.2.4. Einbau radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von Embryonen bei hoher ^{3}H-Aminosäurekonzentration in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (C)

Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen wurden mit 150 µCi Zugabe an ^{3}H-markierten Aminosäuren zum Kulturmedium für unterschiedliche Zeiten (4 bis 16 Stunden) inkubiert und der Einbau der radioaktiv markierten Aminosäuren untersucht.

Tag-10-DO-Embryonen zeigen nach einem ständigen Anstieg im Einbau der markierten Aminosäuren bei 10-stündiger Kultivierung ein Maximum, das auch bei längerer Inkubationsdauer unübertroffen bleibt (Tabelle 16, Grafik 8).

Tag-11-DO-Embryonen zeigen bereits nach nur 6 Stunden Inkubation einen maximalen Einbau an Radioaktivität, der zwar bei längerer Kultivierung geringfügig überschritten wird, aber in der Schwankungsbreite eindeutig auf gleichem Niveau verbleibt (Tabelle 17, Grafik 8).

Wiederum zeigt sich, daß Tag-11-DO-Embryonen nur etwa ein Drittel bis die Hälfte an Radioaktivität bei gleicher Inkubationszeit und gleicher Expositionsmenge im Medium aufweisen, als Tag-10-DO-Embryonen (Grafik 8).



Grafik 8: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen bei Kultivierung in einem hoch radioaktiv markierten Medium (1 ml Tyrode + 150 µCi ^{3}H-AS-Mix) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Tabelle 16: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-10-DO-Embryonen bei hoher Konzentration an ^{3}H-AS im Medium (150 µCi + 1 ml Tyrode-Lösung) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

cpm x 10^3/mg Protein

Unters. Embryonen	4 Std.*	6 Std.	8 Std.	10 Std.	12 Std.
Embryo 1	2865,02	3223,61	3938,79	4381,73	(4151,93)
Embryo 2	2682,76	2736,63	3297,41	4279,14	(5221,20)
Embryo 3	2173,90	2574,25	3439,16	4806,37	(4183,61)
Embryo 4	3223,09	3126,49	3558,45	4287,81	(3745,99)
Embryo 5	1947,19	3274,35	3528,48	5351,25	(4194,13)
Embryo 6	1964,33	2904,48	3200,53	3339,48	(3631,07)
Embryo 7	3643,69	2915,25	2596,66	4084,09	(4581,58)
Embryo 8	2414,86	2980,02	4890,48		
Mittelwerte	2614,36	2966,89	3556,25	4361,41	(4287,07)
Standardabw.	± 590	± 224	± 618	± 575	(±582)

*Inkubationsdauer in Stunden (Std.)

Tabelle 17: Einbau ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Tag-11-DO-Embryonen bei hoher Konzentration an ^{3}H-AS im Medium (150 µCi + 1 ml Tyrode-Lösung) in Abhängigkeit von der Inkubationszeit

Unters. Embryonen	cpm x 10^3/mg Protein		
	4 Std.*	6 Std.	8 Std.
Embryo 1	984,75	1477,13	1569,13
Embryo 2	986,23	1249,87	1502,95
Embryo 3	966,67	1795,94	1204,84
Embryo 4	929,38	1145,04	1287,23
Embryo 5		1449,69	1397,89
Embryo 6		1236,27	1574,63
Embryo 7		1534,28	1543,48
Embryo 8			1661,05
Mittelwerte	966,76	1412,60	1467,65
Standardabw.	± 23	± 206	± 147

*Inkubationsdauer in Stunden (Std.)

2.3.3. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, welche Konzentration an ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium bei gleichzeitiger optimaler Inkubationsdauer NMRI-Postimplantationsembryonen (Tag 10, 11 und 12) benötigen, um einen größtmöglichen Einbau an radioaktiven Aminosäuren in ihre Proteine zu erreichen. Ein einwandfreier morphologisch-physiologischer Zustand sollte dabei ohne Einschränkungen gewährleistet werden.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Kultivierung von N-Embryonen, auch über die Zeit gesehen, zu einem deutlich höheren Einbau führen (hier bis zu 4 x, Versuch (A)) als bei den DO-Embryonen. Dies bestätigt somit die Ergebnisse, die bereits nach nur 4 Stunden in Kultur erzielt wurden, daß N-Embryonen immer mehr Radioaktivität in ihre Proteine einbauen als Embryonen mit Eihüllen (DAO-, DO-Embryonen, siehe Kapitel 2.2.). Der ohnehin eingeschränkte physiologische Zustand der N-Embryonen ließ sich nur bis zu 6 Stunden in vitro ohne Beeinträchtigung aufrecht erhalten, wobei generell eine Weiterentwicklung, gemessen an einer Schwanzsomitenzunahme, zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden konnte. Diese Erkenntnisse und die Tatsache, daß in N-Embryonen die aufgenommene Radioaktivität ungleich verteilt wird (siehe Kapitel 2.2.), führte dazu, daß auf weitere Untersuchungen mit dieser Präparationsmethode verzichtet werden konnte. Daneben widersprach diese Methode auch letztlich der Forderung eines physiologisch unbeschadetem Überlebens in Kultur. N-Embryonen dienten allein dazu, einen Richtwert für einen möglichst hohen radioaktiven Einbau zu liefern, der auch von DO-Embryonen erreicht werden sollte.

Tag-10-DO-Embryonen mit 27 µCi im Kulturmedium zeigen zwar ein bis zu 12 Stunden Inkubationsdauer in jeder Beziehung optimales Überleben, aber erreichen im Maximum doch nur ein gutes Drittel im Einbau der Radioaktivität, die die N-Embryonen unter den gleichen Kulturbedingungen aufweisen (siehe Grafik 6, Versuch (A)). Hingegen ist bei den DO-Embryonen eine Weiterentwicklung in Form einer Schwanzsomitenzunahme mit fortschreitender Kulturdauer festzustellen. Interessanterweise ist der höchste Einbau an radioaktiven Aminosäuren bereits nach 10 Stunden in vitro erreicht. Demnach erfolgt eine normale physiologisch/morphologische Entwicklung bis zu 12 Stunden, biochemisch aber nur bis zu 10 Stunden. In diesem Zusammenhang ist eine Arbeit von COCKROFT (1976) erwähnenswert, bei der ein Vergleich der Entwicklung von in vivo und in vitro bei Rattenembryonen ähnlicher Organogenesestadien und Präparationsmethode (ebenfalls geöffneter Dottersack) untersucht wurde. Hierbei wurde bis zu 12-stündiger Kultivierung kein Unterschied im Wachstum,gemessen an der Gesamtsomitenzahl,festgestellt. In der Proteinsynthese trat aber bei 12 Stunden in vitro ein deutlicher, sich später noch steigender Unterschied (Abfall) zu in vivo-Embryonen auf, obwohl die in vitro-Embryonen noch viele Stunden länger einwandfrei überlebten, als die in vitro-Embryonen in der hier durchgeführten Untersuchung an Mäuseembryonen. Demnach läßt sich sagen, daß ein einwandfreies "biochemisches" Leben in Kultur, gemessen an der Proteinsynthese, nur für einige Stunden gewährleistet werden kann, wohingegen "makroskopische" Beobachtungen ein Überleben noch nach vielen Stunden, wenn nicht sogar, wie oben bei COCKROFT erwähnt, Tagen angezeigt werden kann.

Um bei Embryonen mit Eihüllen einen ähnlich hohen Einbau an radioaktiven Aminosäuren zu erreichen wie bei N-Embryonen, blieb nur der Weg einer Erhöhung der ^{3}H-markierten

Aminosäuren im Kulturmedium (Versuch (B)). Dabei zeigte sich deutlich, daß bei einer "maximalen" Zugabe von 160 µCi (≙ 160 µl) der ^{3}H-AS-Mischung zu 1 ml Kulturmedium nach nur 4 Stunden in vitro ein höherer Einbau erzielt werden kann, als dies bei N-Embryonen selbst nach 12 Stunden Inkubationsdauer mit 27 µCi (≙ 27 µl) der ^{3}H-AS-Mischung der Fall war, ohne eine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit hervorzurufen (Vergleiche Grafik 6 und Grafik 7). Demzufolge sollte eine längere Inkubationsdauer (über 4 Stunden hinaus) bei erhöhter markierter Aminosäurekonzentration im Medium zu einer nochmaligen Steigerung der eingebauten ^{3}H-markierten Aminosäuren in die Proteine von DO-Embryonen führen können, wie dies auch tatsächlich in Versuchsreihe (C) zum Ausdruck kommt. Aufgrund der relativ großen Schwankungsbreite bei Verwendung von 160 µCi (≙ 160 µl) ^{3}H-AS-Mix-Zugabe wurden in Versuch (C) nur 150 µCi (≙ 150 µl) radioaktives Material verwendet. Trotz dieser erniedrigten Dosis konnte über die Zeit gesehen eine etwa 50%ige Steigerung im Einbau der Radioaktivität im Maximum von Tag-10-DO-Embryonen erreicht werden (Vergleiche Grafik 7 mit Grafik 8). Wieder ist bei Tag-10-DO-Embryonen der höchste Einbau an Radioaktivität bei 10 Stunden in Kultur zu finden, wohingegen eine normale äußerliche Lebensfähigkeit bis zu 12 Stunden geht.

Generell läßt sich daraus für Tag-10-DO-Embryonen schlußfolgern, daß zum einen unter den gegebenen Kulturbedingungen (Präparationsmethode, Medium, Begasung, Temperatur, Rotationsmethode und Radioaktivität, wie unter 2.3.1. beschrieben) Untersuchungen über 10 Stunden nicht sinnvoll erscheinen (Überleben und Weiterentwicklung limitiert) und zum anderen, daß bei Verwendung von 150 µCi ^{3}H-AS-Mix im Medium ein relativ optimaler Einbau an ^{3}H-markierten Aminosäuren in die Proteine von DO-Embryonen bei einwandfreiem Überleben erreicht werden kann. Die Radioaktivität übt hier also auch keine negative Wirkung auf den in vitro-Zustand aus. Außerdem zeigen die Ergebnisse wie-

der, wie in Kapitel 2.2. ermittelt, daß Tag-10-Embryonen immer mehr Radioaktivität aufnehmen als die älteren Tag-11- und Tag-12-Embryonen.

Ältere Embryonalstadien (Tag 11, 12) reagieren aufgrund ihres Entwicklungsstandes (z.B. Ernährung über Placenta-Embryo-Blutkreislauf-System) empfindlicher und damit anfälliger auf ein Überleben in vitro als Tag-10-Embryonen (siehe auch Diskussion in Kapitel 2.2.). Besonders deutlich wird dies bei Tag-12-Embryonen, die unter sonst gleichen Kulturbedingungen wie Tag-10- und Tag-11-Embryonen eine Erhöhung der Radioaktivität im Medium, wie unter anderem hier untersucht, nicht überleben. Dieses "totale" Absterben der Embryonen tritt bereits bei 4 Stunden in Kultur ein, die die Tag-12-Embryonen bei niedrigerer Dosis sonst immerhin noch zu über 50% einwandfrei überleben können (siehe Kapitel 2.2.). Deshalb eignen sich Tag-12-Embryonen unter den hier insgesamt erwünschten und getesteten Kulturbedingungen nicht für eine weitere Verwendung und wurden deshalb in dieser Arbeit auch nicht mehr weiter berücksichtigt. Tag-11-Embryonen liegen in ihrem gesamten Verhalten sowohl was die Verträglichkeit von Radioaktivität als auch was die Dauer einer Inkubation betrifft zwischen Tag-10- und Tag-12-Embryonen. Wie Tag-10-Embryonen für 4 Stunden in Kultur zeigen sie bei 160 µCi (≙ 160 µl) ^{3}H-AS-Mix im Medium den relativ höchsten Einbau an markierten Aminosäuren in ihre Proteine (Grafik 7, Kapitel 2.3.2.3., Versuchsreihe (B)). Wie Tag-12-Embryonen fangen sie bei dieser hohen Konzentration an Radioaktivität im Kulturmedium an, empfindlich in Bezug auf ein einwandfreies Überleben zu reagieren, wenn auch noch in geringerem Maße (alle 16 Embryonen überleben, aber nur 11 davon völlig einwandfrei). Insofern war es nicht weiter verwunderlich, daß eine angestrebte Steigerung im Einbau der radioaktiven Aminosäuren über die Zeit gesehen sehr schwierig werden

würde. In der Tat gelang auch nur eine geringe Steigerung bei 6-stündiger Inkubation mit 150 µCi ^{3}H-AS-Mix im Medium, wobei ein Überleben noch voll gewährleistet werden konnte, während bei längerer Kulturdauer allein ein deutliches Absterben zu registrieren war (siehe Tabelle 11). Die Frage hierbei war, sterben die Tag-11-Embryonen aufgrund der hohen Radioaktivität oder wegen der verlängerten Inkubationszeit? In einer hier nicht näher aufgeführten Versuchsreihe wurden Tag-11-Embryonen mit 150 µl-Zugabe einer unmarkierten AS-Mischung (kalte AS-Mix) der gleichen Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Aminosäuren wie die ^{3}H-AS-Mischung unter ebenfalls den gleichen Kulturbedingungen untersucht. Hierbei zeigte sich ganz klar, daß bei 8 Stunden in Kultur nur 11 von 24 untersuchten Embryonen überleben (mit markierten AS waren es 8 von 20 Embryonen). Demzufolge ist nicht die Radioaktivität Schuld am Absterben, sondern in diesem Fall allein die verlängerte Inkubationszeit unter den vorgegebenen Kulturbedingungen.

Insgesamt läßt sich für Tag-11-Embryonen sagen, daß es unter der Zielsetzung dieser Arbeit egal ist, ob man diese Embryonen mit 160 - 200 µCi-Zugabe für 4 Stunden kultiviert oder mit 150 µCi-Zugabe für 6 Stunden, da durchaus gleichwertige Mengen an Radioaktivität in ihre Proteine eingebaut werden. Von der Wirtschaftlichkeit her (Kostenfrage) und der Ausbeute an überlebenden Embryonen wäre allerdings eine Kultivierung mit 150 µCi-Zugabe für 6 Stunden die beste Kulturmethode für Tag-11-Embryonen.

2.3.4. Schlußfolgerungen

Die Untersuchung des Einbaues ^{3}H-markierter Aminosäuren in die Proteine von Postimplantationsembryonen der Tage 10, 11 und 12 in Abhängigkeit von der Konzentration des Isotops und der Inkubationszeit zeigte zusammenfassend folgendes:

1) Steigende Konzentration an Radioaktivität im Medium (bis zu 300 µCi-Zugabe zu 1 ml Medium) führt:

   a) zu einem steigenden Einbau in die Proteine der Tag-10- und Tag-11-DO-Embryonen bis zur Erreichung eines Maximalniveaus bei einer Zugabe von etwa 160 µCi zum Kulturmedium;

   b) zu keiner Beeinträchtigung der Überlebensfähigkeit von Tag-10-DO-Embryonen, wohl aber zu einer Verminderung des Überlebens von Tag-11-DO-Embryonen ab einer Zugabe von 160 µCi zum Kulturmedium; Tag-12-DO-Embryonen überleben keine Steigerung der Radioaktivität über eine 27 µCi-Zugabe hinaus.

2) Längere Inkubation in einem radioaktiven Medium kann ebenfalls zu einer Steigerung im Einbau der Radioaktivität bis zur Erreichung eines Maximalniveaus führen:

   a) Tag-10-DO-Embryonen erreichen dieses Maximum immer nach einer 10 Stunden-Kultivierung, unabhängig von der Menge der hier verwendeten Radioaktivität (27 µCi- oder 150 µCi-Zugabe zu 1 ml Tyrode-Lösung). Bis zu diesem Zeitpunkt ist ein normales Überleben in Kultur immer voll gewährleistet.

   b) Tag-11-DO-Embryonen erreichen unter Berücksichtigung der Schwankungsbreite der Ergebnisse nach 6 Stunden in Kultur ihr Maximum (150 µCi-Zugabe zu 1 ml Tyrode-Lösung), wobei noch alle Embryonen normal überleben. Eine längere Kultivierung führt zu keinem nennenswerten Anstieg im Einbau der Radioaktivität, wohl aber zu einem deutlichen Abnehmen der Überlebensfähigkeit.

Abschließend läßt sich sagen, daß mit der Verwendung von 150 µCi ^{3}H-markierter Aminosäuren zu 1 ml Tyrode-Lösung für 10 bzw. 6 Stunden in Kultur an den beiden embryonalen Entwicklungsta-

gen 10 bzw. 11 sowohl ein optimaler Einbau an Radioaktivität erreicht werden, wie auch ein morphologisch/physiologisch einwandfreies Oberleben in vitro gewährleistet werden kann.

Bei den beschriebenen Untersuchungen zur Optimierung des Einbaues radioaktiver Aminosäuren in die Proteine von kultivierten Mäuseembryonen wurde der biologische Zustand der Embryonen nur nach makroskopisch sichtbaren Kriterien beurteilt. Diese Untersuchungen zielen jedoch auf die Schaffung optimaler Voraussetzungen für die Darstellung zwei-dimensionaler Proteinmuster von Mäuseembryonen ab. Es bleibt demnach zu klären, ob die Radioaktivität sowie die Kulturbedingungen nicht auf der Ebene der Proteine, der Chromosomen oder (und) der morphologischen Feinstruktur der Embryonen zu Schädigungen führen. Diese Probleme wurden in den letzten Kapiteln dieser Arbeit untersucht.

2.4. Einfluß der radioaktiven Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die Chromosomen der kultivierten Mäuseembryonen

2.4.1. Material und Methoden

2.4.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden, wie unter 2.1.1.1. beschrieben, nur NMRI-Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität.

In dieser Untersuchung über einen möglichen Einfluß der radioaktiven Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die Chromosomen von kultivierten Mäuseembryonen wurden nur Postimplantationsembryonen am Tag 10 der Embryonalentwicklung verwendet.

2.4.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente die unter 2.1.1.2. ausführlich beschriebene Tyrode-Lösung. Ein ml dieser Lösung mit dem Zusatz von (A) 150 µl (≙ 150 µCi) der ^{3}H-markierten Aminosäuren, wie bisher verwendet (siehe 2.1.1.2.) oder (B) 150 µl einer unmarkierten Aminosäuremischung gleicher Konzentration und Zusammensetzung wie die markierten, dienten als Kulturmedium.

2.4.1.3. Präparationsmethode

Als Präparationsmethode wurde nur die unter 2.1.1.3. ausführlich beschriebene DO-Präparation angewendet.

2.4.1.4. Inkubationsmethode

Es wurden immer nur 4 Embryonen einer Maus nach der DO-Präparation in einer Bördelflasche mit 1 ml Tyrode-Lösung + 150 µl von (A) ^{3}H-markierten oder (B) unmarkierten Aminosäuren verschlossen, begast und in einem Brutschrank mit Rotor für 8 Stunden unter Standardbedingungen (siehe 2.1.1.4.) inkubiert.

Um die Chromosomen der kultivierten Embryonen (Versuche (A) und (B)) cytologisch untersuchen zu können, wurden 4 Stunden vor Ablauf der regulären Inkubationszeit jeweils 10 µl (≙ 1 Tropfen einer 1 ml Spritze mit einer 0,8-er Kanüle) einer 1% Colcemidlösung (Ciba) hineingetropft.

2.4.1.5. Beurteilung der Embryonen

Alle inkubierten Embryonen wurden nach Ablauf der 8-stündigen Inkubationszeit auf ihre Überlebensfähigkeit nach den unter 2.1.1.5. dargestellten Kriterien untersucht.

2.4.1.6. Chromosomenuntersuchung von Mäuseembryonen

Die cytologische Untersuchung der Mäuseembryonen erfolgte nach einer Colcemid-Behandlung zur Anreicherung von Mitosen mit Metaphasechromosomen. Diese Metaphasechromosomen können dann nach einer speziellen Aufarbeitung und durch bestimmte Färbungstechniken sichtbar gemacht, analysiert und auf mögliche Veränderungen ausgewertet werden (eine allgemeine Übersichtsarbeit ZEINDL u. SPERLING, 1977).

2.4.1.6.1. Anreicherung von Mitosen mit Metaphasechromosomen

Die Anreicherung von Mitosen mit Metaphasechromosomen erfolgte durch eine Colcemid-Zugabe von etwa 0,1 µg/ml für 4 Stunden (siehe 2.4.1.4.).

2.4.1.6.2. Aufarbeitung der kultivierten Mäuseembryonen zur Chromosomendarstellung

Die Aufarbeitung der kultivierten Mäuseembryonen umfaßte folgende Arbeitsvorgänge:

a) Entfernen des Kulturmediums und Freipräparierung der DO-Embryonen in kalter physiologischer Kochsalzlösung zu Nackten-Embryonen (ebenso wie 2.1.1.6. zur Aufarbeitung der Embryonen nach einer Inkubation in einem radioaktiven Medium).

b) Mehrfaches Spülen dieser Embryonen.
- Nur überlebende Embryonen weiter aufgearbeitet, siehe 2.4.2.1. -

c) Stehenlassen von jeweils zwei Embryonen pro Zentrifugenröhrchen in 1 ml 1%iger Trypsinlösung in CMF-Medium (Calzium, Magnesiumfreies Medium, SEROMED) für 10 Minuten bei Zimmertemperatur; dabei mit einer 2 ml Pipette leicht auf- und absaugen, um ein Vereinzeln von Zellen zu erreichen.

d) Stoppen der Trypsin-Behandlung mit 4 ml einer Lösung, bestehend aus Eagle's minimal essential medium (MEM, Seromed) + 10% foetal calf serum (FKS, Seromed) und anschließende Zentrifugation der Gesamtlösung für 10 Minuten bei 900 U/min. Danach Absaugen des Überstandes mittels einer Wasserstrahlpumpe.

e) "Zellsediment" in 5 ml einer auf 37°C vorgewärmten 0,075 M KCL-Lösung resuspendieren und für 25 min bei 37°C im Wasserbad "inkubieren".

f) Entfernen der hypotonen Lösung (0,075 M KCL) durch Zentrifugation (10 min bei 900 U/min) und Absaugen des Überstands mittels einer Wasserstrahlpumpe.

g) Fixieren der Zellen durch Resuspendieren des Zellsediments der Embryonen in 4 ml kaltem Methanol-Eisessig-Gemisch (3 : 1) für 20 min bei Zimmertemperatur.

h) Wieder Zentrifugieren bei 900 U/min für 10 min und Absaugen des Überstandes mittels Wasserstrahlpumpe und dann erneutes Resuspendieren im Fixiergemisch. Diesen Vorgang noch zweimal wiederholen.

i) Zellsuspension auf fettfreie, eisgekühlte Objektträger auftropfen und lufttrocknen.

2.4.1.6.3. Färbung der Maus-Präparate

Die luftgetrockneten Präparate wurden in einer 2%igen Giemsa-Lösung (2 ml Giemsa-Lösung (Merck) + 98 ml Aqua dest) für 10 min gefärbt, in Aqua dest gespült und anschließend wieder luftgetrocknet.

2.4.1.6.4. Auswertung der Metaphasechromosomen

Zur Auswertung der Maus-Chromosomenpräparate wurde ein Leitz-Mikroskop Dialux 20 EB mit Ölimmersion (100-fach) verwendet. Die fotografische Dokumentation erfolgte mit einem am Mikroskop installierten vollautomatischen Kameraaufsatz, Leitz-Vario-

Orthomat. Alle vorhandenen Mitosen mit Metaphasechromosomen wurden auf Chromosomenveränderungen (Chromosomenaberrationen) untersucht.

2.4.2. Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurden Tag-10-DO-Embryonen für 8 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert, wobei entweder (A) 150 µCi/150 µl ^{3}H-markierter oder (B) 150 µl unmarkierter Aminosäuren im Kulturmedium vorhanden waren. Vier Stunden vor Ablauf der Inkubationszeit wurde Colcemid hinzugegeben, um nach Beendigung der Kultivierung eine Chromosomenuntersuchung der in vitro-Embryonen vornehmen zu können.

2.4.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Der Zustand aller inkubierten Tag-10-DO-Embryonen ist in Tabelle 18 zusammenfassend dargestellt. Egal, ob Radioaktivität im Kulturmedium vorhanden war (Versuch (A)) oder nicht (Versuch (B)), es überleben nur etwa 3/4 der jeweils 12 inkubierten Embryonen gut bis "einwandfrei". Die übrigen Embryonen waren als tot zu betrachten. Bei allen überlebenden Embryonen scheint die hintere Extremität nicht so stark ausgebildet worden zu sein, wie es sonst der Somitenanzahl bzw. des Entwicklungsstandes nach der Fall hätte sein müssen. Eine Somitenzunahme war jedoch im üblichen Rahmen festzustellen.

Tabelle 18: Zustand der Tag-10-DO-Embryonen nach 8 Stunden in vitro mit ^{3}H-markierten (A) oder unmarkierten (B) Aminosäuren im Kulturmedium und 4-stündiger Colcemid-Behandlung während der Inkubationszeit

		Qualifizierung des Zustandes der Embryonen nach der Inkubation**									
		Herzschlag				Durchblutung					
Kulturmedium*	Anzahl der Embryonen	-	+	++	+++	-	+	++	+++	Schwanzsomiten	Besonderheiten
(A)	12	1	2	2	7	3	1	5	3	2 - 5	Text
(B)	12	2	1	3	6	2	2	6	2	3 - 7	Text

*Kulturmedium mit (A) ^{3}H-markierten Aminosäuren;
(B) unmarkierten Aminosäuren

**Qualifizierung erfolgte nach den unter 2.1.1.5. beschriebenen Kriterien

2.4.2.2. Analyse der Metaphasechromosomen der kultivierten Mäuseembryonen

Die Chromosomenuntersuchung der aufgearbeiteten Embryonen (jeweils 8 Embryonen der Versuchsreihe (A) und (B)) ergab folgendes Bild:

(A): In Radioaktivität kultivierte Embryonen zeigten in 39,28% aller untersuchten Mitosen mit Metaphasechromosomen unterschiedliche Chromosomenveränderungen (sei es eine Deletion, ein Ring, ein Isochromatidbruch oder Chromatidbruch oder azentrische Fragmente und Gaps). Diese Veränderungen können sowohl einzeln als auch gehäuft innerhalb einer Metaphaseplatte auftreten.

(B): Mit unmarkierten Aminosäuren kultivierte Embryonen zeigten ebenfalls eine Reihe von Chromosomenaberrationen, die sich mit 34,78% aller untersuchten Mitosen zahlenmäßig nicht wesentlich von denen der Versuchsreihe (A) unterscheiden. Ebenfalls kann die Anzahl der Chromosomenaberrationen pro Metaphase sehr verschieden sein.
In nachfolgender Tabelle 19 sind diese Ergebnisse zusammenfassend dargestellt; Abbildung 6 zeigt eine exemplarische Darstellung einer Mitose mit mehreren Chromosomenveränderungen in den Metaphasechromosomen.

Tabelle 19: Testung ^{3}H-markierter und unmarkierter in vitro-Mäuseembryonen auf Chromosomenveränderungen

Unters. Gruppen	Anzahl der unters. Embryonen	Anzahl ausgewerteter Mitosen	Anzahl der Mitosen mit Chromosomenaberrationen absolut	%
^{3}H-markierte Embryonen (A)	8	56	22	39,3
unbeh. Kontroll-Embryonen (B)	8	46	16	34,8

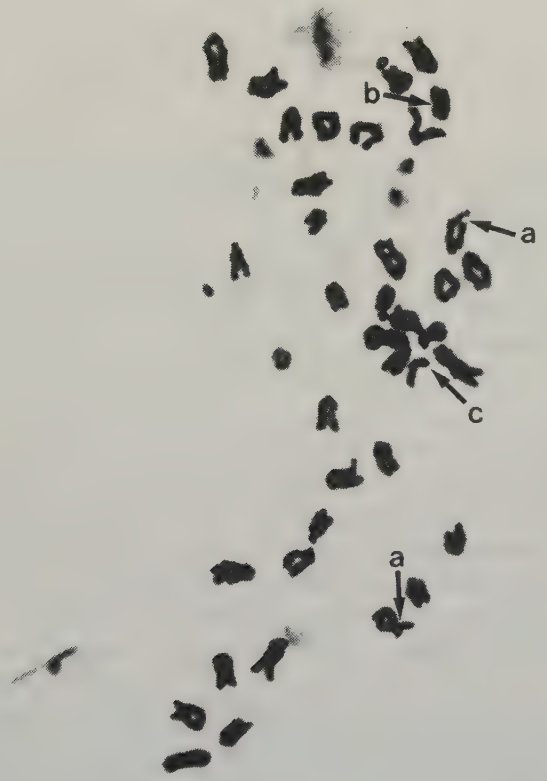


Abbildung 6: Eine Mitose in der Metaphase; einige Metaphase-chromosomen zeigen Aberrationen (siehe Pfeile).
a) Chromatidbruch
b) Chromatid-Gap
c) fragliche Deletion

2.4.3. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, ob die verwendete Radioaktivität innerhalb von 8 Stunden Inkubationsdauer unter Standardbedingungen (2.1.1.4.) zu einer Schädigung der Chromosomen von in vitro-Embryonen führen kann. Hierbei zeigten die Ergebnisse keine wesentliche Erhöhung der Chromosomenaberrationen in den Metaphasen von radioaktiv markierten in vitro-Embryonen (A) im Vergleich zu den Metaphasen von unmarkierten in vitro-Embryonen (B). Eine besondere durch Radioaktivität (in Form der hier verwendeten ^{3}H-markierten Aminosäuren) hervorgerufene "Schädigung" war somit nicht festzustellen (siehe auch Diskussion 2.6.3.).

Bemerkenswert bei dieser Untersuchung war eine auffällig häufige Registrierung von Metaphasen mit Chromosomenaberrationen in beiden Versuchsreihen (A) und (B) und eine geringe Anzahl von auswertbaren Metaphasen. Ob diese Häufigkeit an Veränderungen und die wenigen auswertbaren Metaphasen durch die Colcemid-Behandlung oder der in vitro-Kultivierung als solches hervorgerufen wurden, läßt sich so nicht nachweisen. Um Metaphasechromosomen zu erhalten und analysieren zu können, muß eine Arretierung dieser Chromosomen erfolgen. Hierbei wurde eine ähnliche Konzentration von Colcemid verwendet, wie bei ZEINDL u. SPERLING (1977), modifiziert nach WROBLEWSKA u. DYBAN (1969). Die Wirkungsweise von Colcemid (einem Derivat von Colchizin) als "Spindelfasergift" ist allgemein bekannt. Vielleicht sind hier Nebenwirkungen wirksam, die dazu führen können, daß überhaupt keine oder nur sehr wenige Metaphasen gebildet werden. Beispielsweise wurden in einem nicht näher aufgeführten Nebenversuch Tag-11-DO-Embryonen für 4 Stunden mit 150 µl unmarkierten Aminosäuren (≙ Versuchsreihe (B)) unter Standardbedingungen inkubiert. Für die letzten 2 Stunden der Inkubation wurde die gleiche Konzentration an Colce-

mid verabreicht,wie hier geschehen. Dabei überlebten erstens nur 2 von 8 Embryonen diesen Versuch, was die stark teratogene Wirkung von Colcemid unterstreicht, und zweitens konnten nach der hier beschriebenen Aufarbeitung (alle 8 Embryonen aufgearbeitet) keine auswertbaren Metaphasen gefunden werden.

Sicherlich wird auch der jeweilige Proliferationsgrad der Zellen in den unterschiedlichen Geweben und Organen der Embryonen eine große Bedeutung für die Ausbeute an auswertbaren Metaphasen haben. Ebenso dürfte eine nicht unerhebliche Anzahl der Metaphasen durch die Art der Aufarbeitung verloren gehen. Somit wäre zwar die geringe Anzahl der Metaphasen erklärbar, aber nicht die aufgetretenen häufigen Chromosomenaberrationen. Vielleicht spielt hier der Zeitpunkt der Colcemidzugabe in Verbindung mit den Proliferationsgrad bestimmter Zellen die entscheidende Rolle. Sollten bei Colcemidzugabe bestimmte Zellen in der S-Phase sein und geschädigt werden, so könnte dies zu erhöhten Chromosomenveränderungen in der Metaphase der folgenden Mitose führen. Dies würde auch erklären, warum sowohl bei unmarkierter wie auch bei ^{3}H-markierter in vitro-Kultivierung der Embryonen relativ viele Chromosomenaberrationen festgestellt wurden.

Die beobachtete verminderte Ausbildung der hinteren Extremitätenknospen muß auf die Verwendung von Colcemid zurückgeführt werden, da dies sonst nicht unter den vorgegebenen in vitro-Bedingungen bisher aufgetreten ist.

2.4.4. Schlußfolgerungen

Die Verwendung von ^{3}H-markierten Aminosäuren unter den bereits ermittelten optimalen Kulturbedingungen für Tag-10-DO-Embryonen führt zu keiner Erhöhung der Chromosomenaberrationen im Vergleich zu unmarkierten in vitro-Embryonen. Eine Beeinflussung oder Schädigung durch radioaktiv markierte Aminosäuren auf die Chromosomen der in vitro-Embryonen war somit nicht festzustellen.

2.5. Einfluß der radioaktiv markierten Aminosäuren auf den morphologischen Zustand von kultivierten Mäuseembryonen

2.5.1. Material und Methoden

2.5.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden, wie unter 2.1.1.1. beschrieben, nur NMRI-Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität.

Es wurden nur Postimplantationsembryonen des Tages 10 verwendet.

2.5.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente die unter 2.1.1.2. ausführlich beschriebene Tyrode-Lösung. Ein ml dieser Tyrode-Lösung + 150 µl (≙ 150 µCi) ^{3}H-markierter Aminosäuren wie sie bisher verwendet wurden, bildeten das Kulturmedium.

2.5.1.3. Präparationsmethode

Als Präparationsmethode wurde die unter 2.1.1.3. ausführlich beschriebene DO-Präparation angewandt.

2.5.1.4. Inkubationsmethode

Es wurden immer 4 Embryonen einer Maus nach der DO-Präparation in einer Bördelflasche mit 1 ml Tyrode-Lösung + 150 µl (≙ 150 µCi) ^{3}H-markierter Aminosäuren verschlossen, begast und für 8 Stunden unter Standardbedingungen (siehe 2.1.1.4.) inkubiert (Versuch (A)). In Versuch (B) wurden die Embryonen nicht markiert und nicht inkubiert, sondern nach Ablauf der Inkubationszeit von (A) aus einer Maus entnommen (unmarkierte in vivo-Embryonen).

2.5.1.5. Beurteilung der Embryonen

Alle inkubierten Embryonen wurden auf ihre Überlebensfähigkeit nach den unter 2.1.1.5. dargestellten Kriterien nach Ablauf der Inkubationszeit untersucht.

2.5.1.6. Morphologische Untersuchung von Mäuse-embryonen

Für die lichtmikroskopisch vorgenommene histologische Untersuchung der in vitro- (A) und in vivo- (B) Embryonen wurden folgende Präparationsschritte nach der allgemein üblichen Form der Histologie durchgeführt:

1) Mehrfaches Spülen der freipräparierten Embryonen (≙ N-Embryonen) in kalter physiologischer Kochsalzlösung.

2) Fixierung dieser N-Embryonen in Bouin'scher Lösung in der alkoholischen Modifikation nach DUBOSQ-BRASIL (siehe ROMEIS, 1968, § 307):
   Bouin'sches Fixiergemisch bestehend aus:
   10 Teilen Pikrinsäure in 80% Äthanol
   4 Teilen Formaldehyd 37%
   1 Teil Eisessig.

3) Paraffineinbettung in Paraplast (Lancer, Ireland), einzeln.

4) Herstellung von Serienschnitten ganzer Embryonen an einem Jung-Universal-Mikrotom; Schnittpräparate 5 - 7 µ dick.

5) Standardfärbung der Schnittpräparate durch HE (Hämalaun/Eosin).

6) Fotografieren der HE-gefärbten Schnittpräparate mit Hilfe eines Zeiss-Photomikroskops.

- Genauere Aufstellung und Durchführungsanweisungen sind dem Buch "Mikroskopische Technik" von ROMEIS (1968) zu entnehmen. -

2.5.2. Ergebnisse

In dieser Untersuchung wurden Postimplantationsembryonen am Tag 10 der Embryonalentwicklung unter den bisher als optimal gefundenen Kulturbedingungen inkubiert und auf ihren histologischen Zustand nach der Inkubation analysiert (Versuch (A)). Als Kontrolle und vergleichendes Material dienten Embryonen gleicher Altersstufe, die nach der Inkubationszeit der in vitro-Embryonen (A) einer Maus entnommen wurden ((B) unmarkierte in vivo-Embryonen).

2.5.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Der Zustand der inkubierten Embryonen wurde nach der unter 2.1.1.5. ausführlich geschilderten Methode beurteilt. In Versuchsreihe (A) wurden 8 Embryonen (≙ 2 Kulturflaschen ≙ Embryonen zweier Mäuse) inkubiert, die alle ausnahmslos bestens überlebten, so daß auf eine tabellarische Erfassung ihres Zustandes verzichtet werden konnte.

Als Kontrolle wurden ebenfalls 8 Embryonen (≙ Embryonen zweier Mäuse) vergleichender Größe wie die in vitro-Embryonen verwendet.

2.5.2.2. Lichtmikroskopische Auswertung von Schnittpräparaten von kultivierten Embryonen und Kontrollen

Die lichtmikroskopische Auswertung der histologischen Schnittpräparate von in vitro- (A) zu in vivo- (B) Embryonen ergab folgendes:

1) Vereinzeltes Auftreten von Zellnekrosen bei den kultivierten Embryonen, vor allem im Neuralrohr und auch in einigen Somiten. Herz und mesenchymale Gewebe frei von Nekrosen.

2) Strukturen der inneren Gewebe und Organe der in vitro-Embryonen ebenso gut erhalten wie bei in vivo-Embryonen.

Nachfolgende Abbildungen sind Beispiele des vorgenommenen fotodokumentarischen Vergleichs von in vitro-Embryonen mit in vivo-Embryonen (Abbildungen 7, 8, 9, 10).

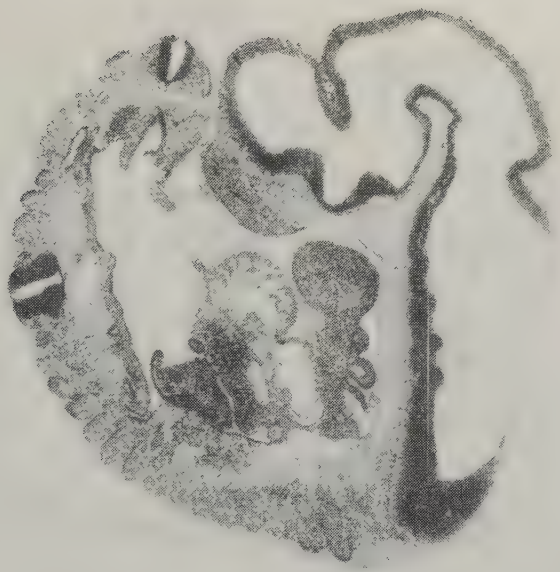


Abbildung 7: Medial-Saggitalschnitt eines in vitro-Embryos (A)
(Nekrosen in dieser Darstellung nicht sichtbar).

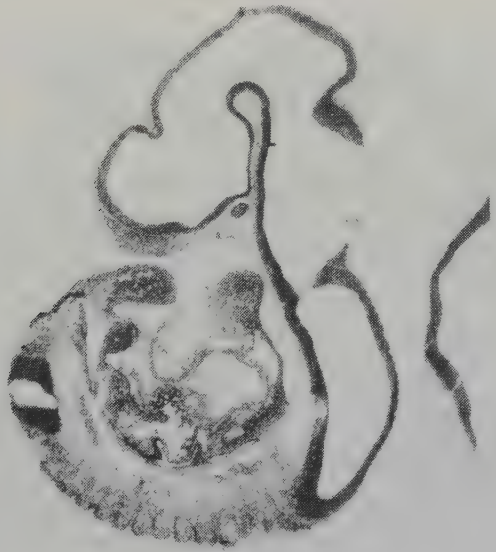


Abbildung 8: Medial-Saggitalschnitt eines in vivo-Embryos (B)

Vergrößerungen 32,0 : 1

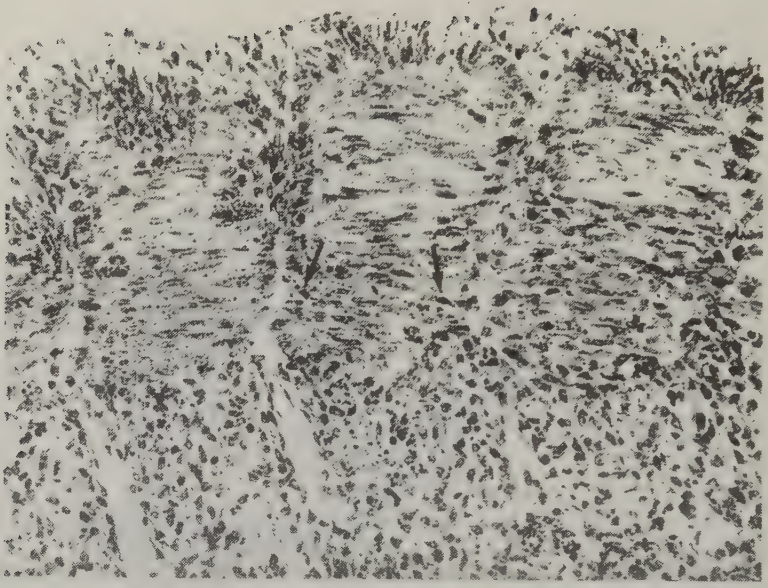


Abbildung 9: Saggitaler Ausschnitt eines Somitenbereiches eines in vitro-Embryos (A). Pfeile markieren Bereiche mit vereinzelten Nekrosen.

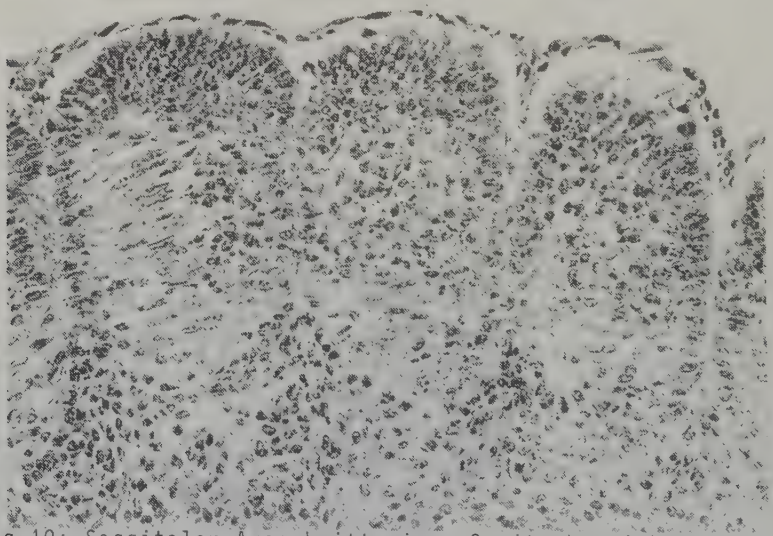


Abbildung 10: Saggitaler Ausschnitt eines Somitenbereiches eines in vivo-Embryos (B).

Vergrößerungen 43,52 : 1

2.5.3. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, ob radioaktiv markierte Tag-10-DO-Embryonen unter den gefundenen optimalen Kulturbedingungen auch in ihrer inneren Morphologie unbeschadet bleiben. Wie den Ergebnissen zu entnehmen ist, entsprechen die mit Radioaktivität kultivierten einwandfrei überlebenden Embryonen in ihrer Morphologie und Histologie weitgehend den in vivo-Embryonen. Eine Ausnahme besteht in der Häufigkeit von beobachteten Zellnekrosen bei den in vitro-Embryonen. Nach HERKEN (persönliche Mitteilung) ist das vereinzelte Auftreten von Zellnekrosen bei kurzzeitigen in vitro-Mauskulturen immer zu beobachten. Es wird als eine Schockreaktion auf die Präparation und der anschließenden in vitro-Kultivierung interpretiert. Nach 24 Stunden in Kultur soll diese Nekrosebildung nicht mehr zu beobachten sein. Dies soll sowohl für Ganzkörperkulturen als auch für Teilkulturen (limb buds) zutreffen. Die Nekrosen in dieser Untersuchung spiegeln sicherlich auch eine beginnende, wenn auch noch nicht sichtbare Abschwächung der Lebensfähigkeit der in vitro-Embryonen wieder.

Insgesamt kann man sagen, daß die in vitro-Embryonen,was den Entwicklungsstand und die Struktur der Gewebe und Organe betrifft, noch mit normalen in vivo-Embryonen vergleichbar sind.

2.5.4. Schlußfolgerungen

Die in dieser Untersuchung unter optimalen Kulturbedingungen gehaltenen Tag-10-DO-Embryonen zeigen nach 8 Stunden in ihrer inneren Morphologie und Histologie eine weitgehende Übereinstimmung mit den Embryonen, die die Inkubationszeit von 8 Stunden noch im mütterlichen Organismus verbrachten.

Auftretende Zellnekrosen bei den kultivierten Embryonen sind systembedingt und offenbar zu diesem Zeitpunkt nur von enger, lokaler Bedeutung.

2.6. Einfluß radioaktiv markierter Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die Proteinmuster von kultivierten Mäuseembryonen, dargestellt durch zwei-dimensionale Elektrophorese

2.6.1. Material und Methoden

2.6.1.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden, wie unter 2.1.1.1. beschrieben, nur NMRI-Mäuse aus der Tierversuchsanstalt Hannover verwendet. Die ersten 24 Stunden nach dem Vorhandensein eines Vaginalpfropfens gelten als Tag 0 der Gravidität (=Paarungstag).

In dieser Untersuchung wurden nur Postimplantationsembryonen des Tages 10 der Embryonalentwicklung verwendet.

2.6.1.2. Präparations- und Kulturmedium

Als Präparationsmedium diente die unter 2.1.1.2. ausführlich beschriebene Tyrode-Lösung. Ein ml dieser Tyrode-Lösung mit dem Zusatz von (A) 150 µl (≙ 150 µCi) der ^{3}H-markierten Aminosäuren, wie sie bisher verwendet wurden, oder (B) 150 µl einer unmarkierten Aminosäuremischung gleicher Konzentration und Zusammensetzung wie die markierten (selbst berechnet und hergestellt) wurden als Kulturmedium angewendet.

2.6.1.3. Präparationsmethode

Als Präparationsmethode wurde die unter 2.1.1.3. ausführlich beschriebene DO-Präparation angewandt.

2.6.1.4. Inkubationsmethode

Es wurden immer 4 Embryonen einer Maus nach der DO-Präparation in einer Bördelflasche mit 1 ml Tyrode-Lösung + 150 µl von (A) ^{3}H-markierten oder (B) unmarkierten Aminosäuren verschlossen und für 8 Stunden unter Standardbedingungen (siehe 2.1.1.4.) inkubiert.

In Versuchsreihe (C) wurden die Embryonen nicht markiert und nicht inkubiert, sondern erst nach Ablauf der Inkubationszeit von (A) oder (B) aus einer Maus entnommen (unmarkierte in vivo-Embryonen).

2.6.1.5. Beurteilung der Embryonen

Alle inkubierten Embryonen wurden auf ihre Überlebensfähigkeit nach den unter 2.1.1.5. ausführlich dargestellten Kriterien nach Ablauf der Inkubationszeit untersucht.

2.6.1.6. Zwei-dimensionale Elektrophorese

Die zwei-dimensionale Gel-Elektrophorese (2DE) wurde hier nach der Methode von KLOSE (1975a, 1981a) mit kleinen Modifikationen übernommen. Die Methode besteht im Prinzip aus einer Kombination von isoelektrischer Fokussierung (IEF), 1. Dimension, gefolgt von einer Elektrophorese (hier SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)),2. Dimension. Als Probe wurde der Proteinextrakt von jeweils den vier Embryonen einer Maus verwendet.

2.6.1.6.1. Probenpräparation

Hierzu wurden alle Embryonen (in vitro ≙ Versuche (A) und (B) und in vivo ≙ Versuchsreihe (C)) in kalter physiologischer Kochsalzlösung freipärpariert (Placenta und Eihüllen entfernt) und mehrfach gründlich gespült. Danach wurden die Embryonen auf einem Aluminiumplättchen in einer trockenen Petrischale liegend mittels einer feinen ausgezogenen Pipette von allen äußeren Flüssigkeiten befreit und in das Alu-Plättchen eingerollt in einem Eppendorf-Gefäß (mit 3 Löchern im Deckel) in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die eingefrorene Probe kann auf diese Weise, soweit es das verwendete Isotop aufgrund seiner Halbwertzeit erlaubt, auch längere Zeit aufbewahrt werden. Eine eingefrorene Probe besteht immer aus den vier Embryonen einer Maus.

Zur Gewinnung des Proteinextraktes wurden die Embryonen einer Probe genau ausgewogen und in Macrolon Tubes überführt. In den Macrolon Tubes wurden die Embryonen mit einer Harnstofflösung im Verhältnis 1 : 1 (Gewicht der Embryonen in mg : Volumen der Harnstofflösung in µl) versetzt und homogenisiert. Die verwendete Harnstofflösung bestand aus: 300 mg Harnstoff (Merck), 25 µl Ampholin pH = 5 - 7 (Serva) und 25 µL Mercaptoäthanol (Merck) mit Aqua dest auf ein Endvolumen von 0,5 ml aufgefüllt. Homogenisiert wurde mit einer Drahtschlinge, die an einem Motor befestigt war, bei 900 U/min für die Dauer von 3 min, wobei der Macrolon Tube langsam kreisend gegen die Drahtschlinge gedrückt wurde. Anschließend wurden die Homogenate in einem 50 Ti Rotor bei etwa 50 000 U/min bzw. 225 000 x g für 30 min zentrifugiert. Der Oberstand, der die durch die bisherige Behandlung gelösten Proteine enthielt, konnte nun direkt für die zwei-dimensionale Gel-Elektrophorese benutzt werden oder wurde zur Aufbewahrung wieder in N_2 eingefroren.

2.6.1.6.2. Isoelektrische Fokussierung (IEF) - 1. Dimension

Die Isoelektrische Fokussierung wurde in 7 cm x 0,3 cm (Länge x Durchmesser) großen Polyacrylamid-Gelen, die in Plastikröhrchen gegossen waren, vorgenommen. Diese Methode ist bei KLOSE (1975a, b und 1979) ausführlich beschrieben und wurde hier weitgehend übernommen. Eine Ausnahme war, daß das hier verwendete Ampholingemisch aus 4 Teilen Ampholin pH = 5 - 7 (Serva) und 2 Teilen Ampholin pH = 3,5 - 10 (LKB, Bromma, Schweden) bestand. Außerdem bestand die aufzutragende Protein-Proben-Mischung für die 1. Dimension aus 12,5 µl der Proteinlösung (s.o. Überstand nach der Zentrifugation) und 27,5 µl einer Sephadex G-200 Superfine (Pharmacia Uppsale, Schweden) Lösung, die, wie bei KLOSE und FELLER (1981a) beschrieben, mit Sacharose, Harnstoff, Mercaptoäthanol und Ampholinen vermischt und aufgequollen war. Insgesamt wurden also 40 µl Protein-Proben-Mischung für die 2DE verwendet.

2.6.1.6.3. SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE)-
2. Dimension

Nach Trennung der Proteine in der 1. Dimension (Isoelektrische Fokussierung) wurde das Gel sofort für die 2. Dimension auf eine Flachgel-Apparatur (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt) gelegt. Die Maße des Flachgels betrugen 6,5 x 7,5 x 0,3 cm. Die genaue Zusammensetzung des 15%igen kontinuierlichen Polyacrylamid-2-D-Flachgels sowie der gesamte weitere Ablauf entsprachen der oben erwähnten Methode nach KLOSE und FELLER (1981a).

Die nach der 2DE getrennten Proteine wurden fixiert und mit Coomassie Brilliant Blue R 250 gefärbt. Die Aufbewahrung dieser Gele erfolgte in 7%iger Essigsäure bzw. für längere Zeit durch Einschweißen in durchsichtiger Schlauchfolie.

2.6.1.6.4. Gel-Auswertung

Die Gelauswertung erfolgte durch visuellen paarweisen Vergleich der Spotmuster eines gemeinsamen 2DE-Laufes. Unterschiede zwischen zwei korrespondierenden Spots können sich als Intensitätsunterschied, als Positionsunterschied oder durch Fehlen des Spots in einem der beiden Muster äußern. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde nur die Gesamtzahl der Unterschiede angegeben, d.h. es erfolgte keine Aufschlüsselung der Daten nach den verschiedenen Variationstypen.

2.6.1.6.4.1. Fotografische Wiedergabe der Proteinmuster

Zur Dokumentation der Proteinmuster wurden die Gele auf einem Leuchtkasten (Leitz, Typ 42 - 677.103) voll ausgeleuchtet und mittels eines Reprovit (Leitz, Typ II a) mit passender Kamera (Leica Mda) und Gelbfilter (B & W, Nr. 36 mit Verlängerungsfaktor 3) sowie eines Agfaortho 25-Films bei Blende 16 mit 3 oder 4 sec. Belichtungszeit fotografiert. Die Film-Entwicklung und -Fixierung erfolgte nach üblicher Verfahrensweise.

2.6.2. Ergebnisse

In der vorliegenden Untersuchung wurden Tag-10-DO-Embryonen für 8 Stunden unter Standardbedingungen mit (A) 150 µl (≙ 150 µCi) ^{3}H-markierten- oder (B) 150 µl unmarkierten Aminosäuren (gleicher Konzentration und Zusammensetzung) im Kulturmedium inkubiert und die nach der 2DE-Methode entstandenen Proteinmuster gegen- und untereinander hinsichtlich quantitativer und qualitativer Unterschiede verglichen. Zusätzlich wurden noch (C) unmarkierte in vivo-Embryonen als Vergleichskontrollen zu den unmarkierten in vitro-Embryonen (B) in diese Untersuchung mit einbezogen.

2.6.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Der Zustand aller inkubierter Embryonen nach der 8-stündigen Inkubationszeit wurde nach der unter 2.1.1.5. ausführlich geschilderten Methode beurteilt. In den Versuchen (A) und (B) wurden jeweils 40 Embryonen (≙ 10 Proben ≙ 10 Kulturflaschen ≙ 10 Mäuse) inkubiert, die alle ohne Ausnahme ausgezeichnet überlebten, so daß auf eine weitere tabellarische Erfassung der überlebenden verzichtet werden konnte.

2.6.2.2. Einfluß radioaktiv markierter Aminosäuren und der allgemeinen Kulturbedingungen auf die 2DE-Proteinmuster von in vitro-Embryonen

Die Proteinmuster von jeweils fünf Gelpaaren (≙ 10 verschiedene Proteinproben) von (A) ^{3}H-markierten in vitro-, (B) unmarkierten in vitro- und (C) unmarkierten in vivo-Embryonen wurden sowohl unter sich als auch gegeneinander, d.h. (A) mit (B) und (B) mit (C) verglichen und hinsichtlich quantitativer und qualitativer Unterschiede in den Proteinspots untersucht. Von jedem Proteinmuster wurden etwa 500 eindeutig erkennbare Spots ausgewertet. Die Anzahl der Proteinvarianten, die bei paarweisem Vergleich der Proteinmuster entdeckt wurden, sind in nachfolgender Tabelle 20 angegeben (siehe auch exemplarische Abbildungen 11, 12, 13 und 14).

Die Vergleiche der durchschnittlichen Anzahl der gefundenen variablen Proteinspots führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Keine Erhöhung der Anzahl der Proteinvarianten bei Verwendung von radioaktiv markierten Aminosäuren (Vergleiche (A) zu (B) mit den Ergebnissen von (A) zu (A) und (B) zu (B).

2. Keine Erhöhung der Anzahl der Proteinvarianten bei Kultivierung der Embryonen (Vergleiche (B) zu (C) mit den Ergebnissen von (B) zu (B) und (C) zu (C)).

Tabelle 20: Vergleich der Proteinmuster von in vitro- (^{3}H-markiert und unmarkiert) und in vivo-Embryonen mit Hilfe der 2DE-Technik

Verglichene Versuchsbedingungen*	Anzahl der untersuchten Gelpaare	Anzahl unterschiedlicher Proteinspots	Durchschnittliche Anzahl unterschiedlicher Proteinspots
(A) - (A)	5	4,8,9,17,11	10
(B) - (B)	5	19,13,11,8,25	15
(A) - (B)	5	10,12,15,9,12	12
(C) - (C)	5	11,9,20,8,18	13
(B) - (C)	5	19,16,28,10,17	18

* (A) ^{3}H-markiert in vitro;

(B) unmarkiert in vitro;

(C) unmarkiert in vivo.

Abbildung 11: 2DE-Proteinmuster von (A) in vitro. ^{3}H-markiert

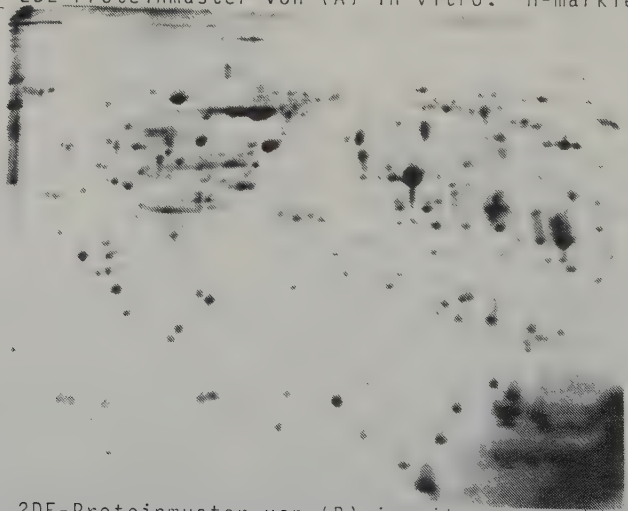


Abbildung 12: 2DE-Proteinmuster von (B) in vitro, unmarkiert

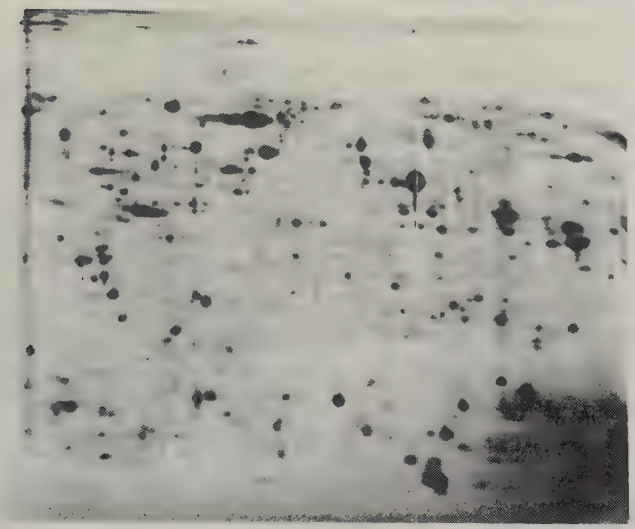


Abbildung 13: 2DE-Proteinmuster von (B) in vitro, unmarkiert

Abbildung 14: 2DE-Proteinmuster von (C) in vivo, unmarkiert

2.6.3. Diskussion

Ziel dieser Untersuchung war festzustellen, ob die verwendete Radioaktivität (hier in Form von 150 µCi einer ^{3}H-AS-Mix) zu einer Veränderung der 2DE-Proteinmuster führen kann. Darüber hinaus wurden die Proteinmuster zu einer Untersuchung der Frage verwendet, ob auf der Proteinebene ein Unterschied zu erkennen ist, je nachdem, ob die Embryonen sich unter in vivo- oder in vitro-Bedingungen befanden. Mit anderen Worten: Dieser Vergleich sollte zeigen, ob die bisherige makroskopische, chromosomale und morphologische/histologische Beobachtung, daß die NMRI-Embryonen in vitro unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen einwandfrei überleben, auch mit einer biochemischen Methode bestätigt werden kann.

Wie die Ergebnisse zeigen, findet man trotz einer großen Anzahl untersuchter Proteinspots (annähernd 500 Spots pro Gel) 1) keine Erhöhung in der Anzahl der Proteinvarianten von ^{3}H-markierten in vitro-Embryonen zu unmarkierten in vitro-Embryonen (Vergleich (A) und (B)) und 2) ebenfalls keine Erhöhung im Vergleich von unmarkierten in vitro-Embryonen zu unmarkierten in vivo-Embryonen (Vergleich (B) zu (C)). Den Ergebnissen zufolge hatten weder die Radioaktivität der eingebauten Aminosäuren noch die anderweitigen Kulturbedingungen eine schädigende Wirkung auf die Proteinmuster der Embryonen.

Ähnliche Untersuchungen wurden von ZEINDL und KLOSE (1984) an Zellmaterialien (CHO-, Hep-, Hela-Zellen) in vitro durchgeführt. Hierbei zeigte sich ebenfalls, daß Radioaktivität markierter Aminosäuren (^{14}C-AS-Mix mit vergleichbarer Zusammensetzung wie ^{3}H-AS-Mix) zu keinen Veränderungen der Proteinmuster führt. Eine Schädigung der in vitro behandelten Zellen war jedoch sowohl zeit- als auch konzentrationsabhängig durchaus festzustellen. Dabei wurden sowohl steigende Chromosomen-

aberrationen in den untersuchten Metaphasen gefunden wie auch ein Abnehmen der Überlebensrate der Zellen (plating efficienty).

Ursachen für die Diskrepanz zwischen zellulärer Schädigung einerseits und normalen Proteinmustern andererseits wurden bei ZEINDL und KLOSE (1984) diskutiert. Die Schädigung der kultivierten Zellen in Gegenwart von ^{14}C-Aminosäuren könnte auf die 8,8-fach stärkere Strahlungsenergie im Vergleich zu den hier verwendeten ^{3}H-Aminosäuren zurückzuführen sein. Ferner könnte eine Rolle spielen, daß bei Zellkulturen durch die unmittelbarere Aufnahme der Radioaktivität durch jede einzelne Zelle in kürzerer Zeit mehr Radioaktivität aufgenommen wird und somit Schäden schneller wirksam werden können wie bei ganzen komplexen Organismen wie Tag-10-Mäuseembryonen.

Trotzdem wäre gerade die Verwendung von ^{14}C-markierten Aminosäuren in diesem bisher erarbeiteten optimalen Kultursystem von großem Nutzen. Eine solche Anwendung würde in Verbindung mit fluorographischen Methoden zu einer höheren Auflösung und vor allem zu einer zeitlich schnelleren Auswertung von zwei-dimensionalen Proteinmustern führen, da durch die starke Strahlungsenergie des ^{14}C die Expositionszeit erheblich verkürzt werden könnte gegenüber ^{3}H-markierten zwei-dimensionalen Proteinmustern.

In einem hier nicht näher beschriebenen Versuch wurden Tag-10-DO-Embryonen statt mit 150 µCi/ml ^{3}H-AS-Mix mit 100 µCi/ml ^{14}C-AS-Mix (gleiche Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Aminosäuren wie ^{3}H-AS-Mix) nach der üblichen Methode inkubiert. Das Ergebnis zeigte, daß nach den 8 Stunden in vitro keiner von 12 getesteten Embryonen überlebte. Es trat hier somit das Problem der starken Strahlungsenergie von ^{14}C auf. Wurden jedoch nur 20 µCi/ml ^{14}C-AS-Mix verwendet (also

grob ein Achtel von der optimalen Menge von ^{3}H-AS-Mix), zeigten alle untersuchten 12 Embryonen (≙ 3 Kulturflaschen) nach 8 Stunden Inkubation ein genauso einwandfreies Überleben wie es bei Verwendung von 150 µ Ci/ml ^{3}H-AS-Mix der Fall gewesen war. Demnach ist es egal, ob man Tag-10-DO-Embryonen mit ^{3}H- oder ^{14}C-markierten Aminosäuren inkubiert, wenn man die Strahlungsenergie entsprechend berücksichtigt.

Es gibt eine Reihe von Untersuchungen der Embryonalentwicklung der Maus, bei denen gefunden wurde, daß radioaktive Isotope (^{3}H, ^{14}C, ^{35}S als einzeln markierte Aminosäuren oder Gemische verwendet) zu Zellschäden und Degradationen unterschiedlichen Ausmaßes, wenn nicht sogar zum Tode innerhalb kurzer Zeit führen können (TÄGDER u. SCHEUERMANN, 1970; SNOW, 1973; HORNER u. McLAREN, 1974; EIBS et al., 1979; MACQUEN, 1979; CULLEN et al., 1980; RAHMSDORF et al., 1981; JOHNSON u. ROSSANT, 1981). Die Frage der Schädigung hängt danach von verschiedenen Faktoren ab: Dem untersuchten Entwicklungsstadium (Morula, Blastula, Pre- oder Postimplantationsstadium bzw. sensitive Phasen, Zellzyklen), der Menge und Art der Radioaktivität (spezifische Radioaktivität, Endkonzentration im Medium, Isotopenart ^{3}H, ^{14}C, ^{35}S) und von der Dauer der Exposition (30 min bis mehrere Tage). Als ein Beispiel sei die Arbeit von MACQUEN (1979) herausgegriffen, bei der eine Kultivierung von Preimplantations-Mäuseembryonen mit (^{3}H)-Methionin in der Konzentration von 200 µCi/ml Medium keinerlei Einschränkungen im Oberleben hervorrief, wohingegen die gleiche Menge (^{14}C)-Methionin innerhalb weniger Stunden absolut tödlich wirkte. Dieser Effekt begann bereits bei Verwendung von 1 µCi/ml Medium, steigerte sich bei 7 µCi/ml Medium soweit, daß keiner der inkubierten Embryonen eine kompakte Morula mehr ausbilden konnte und führte bei Verwendung von 10 µCi (^{14}C)-Methionin/ml Medium zum Tode aller Embryonen.

2.6.4. Schlußfolgerungen

In der vorliegenden Untersuchung überlebten alle Tag-10-DO-Embryonen eine Inkubation von 8 Stunden mit 150 µCi/ml einer ^{3}H-AS-Mischung in ihrem Kulturmedium und zeigten in ihren zweidimensionalen Proteinmustern keine höhere Zahl an Proteinvarianten als Embryonen, die mit unmarkierten ("kalten") Aminosäuren inkubiert wurden. Ein Vergleich der Proteinmuster der kultivierten Embryonen mit denen von Embryonen, die die Inkubationszeit von 8 Stunden noch im mütterlichen Organismus verbrachten, zeigte keine Unterschiede in der Häufigkeit von Proteinvarianten.

Im einzelnen nicht aufgeführte Versuche und theoretische Überlegungen führen zu der Aussage, daß unter den hier erarbeiteten Bedingungen Tag-10-DO-Embryonen mit 20 µCi/ml ^{14}C-AS-Mix genau so erfolgreich kultiviert werden können wie mit 150 µCi/ml ^{3}H-AS-Mix.

2.7. Darstellung der Proteine von kultivierten Mäuseembryonen durch zwei-dimensionale Elektrophorese und Fluorographie

2.7.1. Material und Methoden

Die in den vorigen Kapiteln (2.4., 2.5., 2.6.) bestätigten optimalen Kulturbedingungen für den Einbau radioaktiv markierter Aminosäuren in die Proteine von NMRI-Tag-10-DO-Embryonen wurden hier, was Materialien und Methoden betrifft, in vollem Umfang übernommen. Statt der bisher üblichen 150 µCi/ml einer ^{3}H-AS-Mischung im Kulturmedium wurde hier jedoch 20 µCi/ml einer ^{14}C-AS-Mischung (Amersham Buchler, England, Code Nr. CFB 25, Radioaktive Konzentration 1 mCi/ 1 ml) verwendet (siehe 2.6.3.).

2.7.1.1. Zwei-dimensionale Elektrophorese mit radioaktiv markierten Proteinen

Die 2DE wurde in dieser Untersuchung nach einer von KLOSE (1983) modifizierten Technik durchgeführt, die dem hohen Auflösungsvermögen von radioaktiven Proteinproben Rechnung trägt. Die genaue Anleitung und Auflistung aller Lösungen, Materialien und nötigen Geräte sind dem Übersichtsartikel von KLOSE (1983) zu entnehmen. Diese Methode unterscheidet sich von der unter 2.6 1.6. aufgeführten Methode für gefärbte Proteinmuster in folgenden Punkten:

1) Größe des Polyacrylamidgels in der 1. Dimension: 20,5 x 0,09 cm (Länge x Innendurchmesser), gegossen in 23 cm langen Glasröhrchen;

2) geringe Probenmenge (5 - 7 µl);

3) Polyacrylamidzusammensetzung der 2. Dimension: 11 - 22 %iger Gradientengel;

4) Größe des Polyacrylamidgels in der 2. Dimension: 29,5 x 23 x 0,9 cm, Desaga-Apparatur, Desaphor VA 300 (Desaga, Heidelberg).

Sowohl für die 1. als auch für die 2. Dimension wurde hier das LKB Power Supply Gerät: Bromma 2197 (LKB, Bromma, Schweden) verwendet, das entsprechend den wesentlich größeren Gelen eine stärkere Leistung aufbringt.

Nach der 2. Dimension wurden die Gele für 1 Stunde bei Zimmertemperatur in einer Fixierlösung gerührt. Sie bestand aus: 1 500 ml Methanol + 1 200 ml Aqua dest + 300 ml 100%iger Essigsäure. Anschließend wurden die Gele für 10 min in folgender Lösung bewegt: 150 ml Methanol + 375 ml 100%iger Essigsäure und 2 475 ml Aqua dest. Die Sichtbarmachung der Proteinflecken erfolgte durch die Fluorographie.

2.7.1.2. Fluorographie

Die Fluorographie wurde mit kleinen Änderungen, bedingt durch die Gelgröße, nach der Methode von BONNER und LASKEY (1974) durchgeführt. Als Fluoreszens-Mittel diente eine 20%ige PPO (2,5-Diphenyloxazol, Packard USA) Lösung, wobei das PPO in DMSO (Dimethylsulfoxid, reinst,Ferak, Berlin) gelöst wurde. Die fluorographische Behandlung selbst wurde mit den fixierten Gelen wie folgt durchgeführt:

Ein Gel wurde in einer spezialangefertigten VA-Stahlwanne mit DMSO gut bedeckt (etwa 1 500 ml DMSO) und über Nacht auf einem Schüttelapparat (Guwina-Hofmann GmbH) langsam bewegt. Dabei wurde die Wanne von einem ebensolchen VA-Stahldeckel abgedeckt, um eine Verdunstung von DMSO zu vermeiden. Am nächsten Tag erfolgte die Fluoreszens-Behandlung. Dazu wurde das Gel für 3,5 Stunden in eine PPO/DMSO-Lösung (180 g PPO + 872 DMSO) gelegt und wieder sanft geschüttelt. Während dieser PPO/DMSO-Behandlung schrumpft das Gel merklich zusammen. Das Gel ist immer noch durchsichtig. Nach dieser Zeit wird das Gel unter fließendem Wasser (Aqua dest) abgespült und für 1 Stunde in 2 000 ml Aqua dest weiterbewegt. Hierbei wird das Gel bereits bei der Berührung mit Wasser schlagartig undurchsichtig weiß, ein Zeichen dafür, daß das Gel ausreichend mit PPO durchsetzt werden konnte und quillt während dieser Zeit wieder auf seine Ausgangsgröße auf. Die anschließende Geltrocknung erfolgte wie bei KLOSE (1983) beschrieben mit der Ausnahme, daß das Gel auf einer angefertigten VA-Stahlplatte mit Absaugrillen (40 x 33 cm) verbunden mit einer Wasserstrahlpumpe in einem 50°C Brutschrank über Nacht getrocknet wurde. Das so getrocknete Gel wurde dann in einer Auer-Unix-Röntgen-Kassette (35,6 x 43,2 cm; Auer GmbH, Berlin) gelegt, mit einem Kodak X-Omat AR 5 Röntgenfilm (Eastman Kodak Comp., Rochester, New York) und einer 3 mm starken Zellastikmatte bedeckt und lichtdicht verschlossen bei - 70°C exponiert.

Nach der vorgesehenen Expositionszeit wurde die Röntgenkassette zuerst eine halbe Stunde bei Zimmertemperatur aufgetaut, ehe der Film entnommen werden konnte. Der exponierte Film wurde dann in einer Entwicklerlösung (Kodak LX 24, 1 Teil Entwickler + 4 Teile Aqua dest) für 6 min entwickelt, 30 sec mit Aqua dest gespült und mit Fixierlösung (Kodak AL 4, 1 Teil Fixierer + 4 Teile Aqua dest) für 10 min fixiert. Bei all diesen Vorgängen wurden die Lösungen bzw. das Gel in diesen Lösungen bewegt. Zum Abschluß wurde ein solch behandeltes Gel noch mindestens 10 min in Aqua dest gespült, ehe es zum Lufttrocknen aufgestellt oder aufgehangen wurde. Ein so getrockneter Röntgenfilm zeigt dann der aufgetragenen Radioaktivität bzw. der Expositionszeit entsprechend ein weitgefächertes Proteinmuster von grau-schwarzen Punkten (=Proteinspots) auf einem hellgrauen durchsichtigen Hintergrund.

Auf ein so behandelt und getrocknetes Gel kann beliebig oft ein Röntgenfilm wieder aufgelegt werden. Die Expositionszeit kann dabei variiert werden. Das ermöglicht die Zahl der entdeckbaren Spots zu steigern.

2.7.2. Ergebnisse

In der hier beschriebenen Untersuchung wurden Tag-10-DO-Embryonen für 8 Stunden unter Standardbedingungen mit 20 µl (≙ 20 µCi) ^{14}C-markierten Aminosäuren im Kulturmedium inkubiert und die durch 2DE (KLOSE, 1983) entstandenen Proteinmuster mittels Fluorographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.7.2.1. Zustand der Embryonen nach Inkubation

Der Zustand der acht inkubierten Embryonen (≙ 2 Kulturflaschen) war einwandfrei und wurde daher nicht tabellarisch erfaßt.

2.7.2.2. Fluorographie zwei-dimensionaler Proteinmuster von kultiverten Mäuseembryonen

Von jedem einzelnen Tag-10-Embryo konnte mindestens ein fluorographisches Proteinmuster hergestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß durch Fluorographie von ^{14}C-markierten Proteinen nach 21 Tagen Expositionszeit 3 431 gut erkennbare Proteinspots sichtbar werden (Abbildung 15). Diese Ausbeute an Proteinspots ließ sich durch Verwendung noch größerer Gele (Gelgröße der 2. Dimension: 42 x 33 x 0,085 cm (KLOSE, 1983)) bei gleicher Expositionszeit noch auf 5 482 Proteinspots pro Fluorogramm steigern.

Dies entspricht einer Steigerung um das 11-fache im Vergleich zu den etwa 500 erkennbaren Proteinspots der gefärbten Gele (siehe voriges Kapitel 2.6.). Außerdem betrug die hier in Anwendung gekommene Proteinprobenmenge mit 5 µl nur etwa 40% der für "gefärbte" Gele notwendigen Probenmenge von 12,5 µl (siehe ebenfalls Kapitel 2.6.).

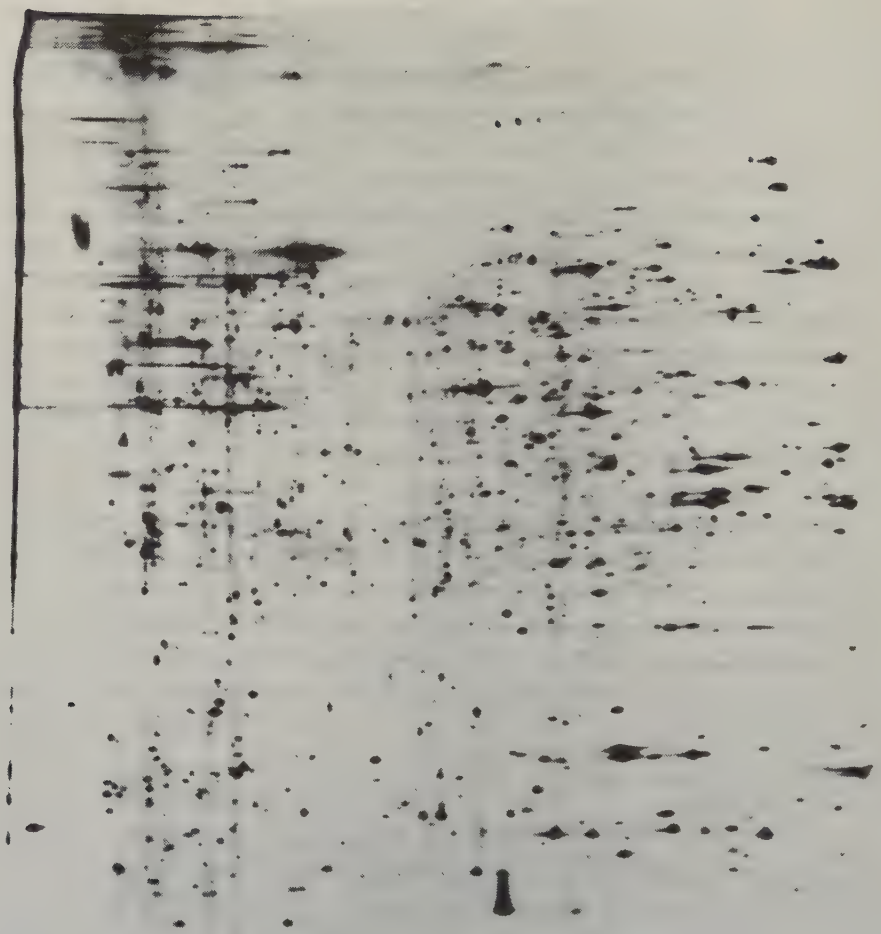


Abbildung 15: Fluorographisches Proteinmuster mit 3 431 erkennbaren Polypeptiden eines kultivierten Tag-10-DO-Embryos nach 21 Tagen Expositionszeit. Die Kultivierung erfolgte mit ^{14}C-markierten Aminosäuren unter den hier ermittelten optimalen Kulturbedingungen.

2.7.3. Diskussion

Die Fluorographie wird allgemein seit den grundlegenden Arbeiten von BONNER und LASKEY (1974) und LASKEY und MILLS (1975) zur Feststellung von Radioaktivität (speziell ß-Strahlern wie ^{3}H, ^{14}C und ^{35}S) in Polyacrylamidgelen genutzt. Dabei macht man sich die Eigenschaft zu Nutze, daß ß-Strahler, die normalerweise direkt auf eine Photoemulsion einwirken können (Autoradgiographie), in der Lage sind mittels eines Scintillators ("Fluoreszensmittel") wie PPO so viele Photonen zu erzeugen, daß auch bei geringer Radioaktivität eine Schwärzung einer Photoplatte oder eines Röntgenfilmes erreicht werden kann. Die Fluorographiemethode führt dabei,im Gegensatz zur herkömmlichen Autoradiographie bei Verwendung von ^{14}C- oder ^{35}S-Verbindungen,zu einer mehr als 10fachen Steigerung in der Sensitivität und erlaubt bei einer ^{3}H-Markierung die Anwendung von so geringen Mengen an Radioaktivität, die mit den sonst üblichen konventionellen Mitteln nicht mehr registriert werden könnten. Gerade diese tritium-markierten Verbindungen spielen für die Markierung biologischer Makromoleküle eine bedeutende Rolle, weil sie wegen ihrer "niedrigen" Emissionsenergie wenig Schäden im Organismus hervorrufen und in sehr hoher spezifischer Radioaktivität zur Verfügung stehen (BONNER u. LASKEY, 1974; McQUEN, 1979; CHAMBERLAIN, 1979; KLOSE et al., 1979). Außerdem können für die Fluorographie auch ^{35}S- und ^{14}C-Verbindungen in niedrigen und damit unschädlicheren Dosen angewandt werden und trotzdem eine hohe Ausbeute an Proteinspots von 2DE-Gelen ermöglichen (KLOSE et al., 1979). Unter den verwendeten Bedingungen, d.h. bei 20 µCi ^{14}C-markierten Aminosäuren pro ml Kulturmedium und einer Probenmenge für die 1. Dimension von nur 5 µl ergaben sich relativ lange Expositionszeiten. Diese relativ lange Expositionszeit lag einerseits an der geringen Probenmenge,

die von einem einzelnen Tag-10-Embryo gewonnen werden kann, andererseits an der Feststellung, daß die Einbaurate an radioaktiven Aminosäuren (750 000 dpm/5 µl Proteinprobe) nicht gesteigert werden konnte, ohne den normalen physiologischen Zustand der Embryonen zu gefährden. Ähnliche Untersuchungen an menschlichen Fibroblasten (ZEINDL u. KLOSE, 1984) zeigten bei Verwendung von 20 µCi ^{14}C-Aminosäuren/ml Medium in 4,5 µl Proteinprobe 5 250 000 dpm Radioaktivität. Unter diesen Bedingungen wurde in wenigen Tagen Expositionszeit ein sehr ausgeprägtes hochaufgelöstes Proteinmuster auf dem Röntgenfilm erhalten.

Die Ergebnisse haben gezeigt, daß mit Hilfe der 2DE und der Fluorographie von einzelnen, noch relativ frühen Mäuseembryonen eine sehr große Zahl an Proteinen dargestellt werden kann. Diese Methodik hat besondere Bedeutung für genetische Untersuchungen, bei denen es darum geht, Veränderungen einzelner Gene (Genmutationen) in einzelnen Individuen nachzuweisen. Eine umfangreiche Studie zur Untersuchung der mutagenen Eigenschaften von Äthylnitrosoharnstoff wird zur Zeit mit dieser Methode durchgeführt (NOWAK u. KLOSE, 1984). Diese Untersuchung dient als ein Modellversuch für die Anwendung der 2DE zur Testung chemischer Substanzen auf Mutagenität in einem für den Menschen relevanten in vivo-System. Darüber hinaus wird mit der 2DE/Fluorographie-Methode die natürliche genetische Variabilität der Proteine der Maus untersucht (NOWAK u. KLOSE, 1984). Hierbei werden die Proteinmuster von Tag-10-Embryonen verschiedener Mäuseinzuchtstämme auf ihre genetische Variabilität hin analysiert. Die Untersuchungen gehen der Frage nach, ob zwischen den natürlich auftretenden genetischen Proteinvarianten, die das Ergebnis von Mutation, Selektion und genetischer Drift sind

und den chemisch induzierten Varianten, die von einer Generation auf die andere entstehen, gemeinsame Charakteristika zu finden sind. Daraus ließen sich Schlußfolgerungen ziehen für die Konsequenzen, die durch den Einfluß von Umweltmutagenen auf den Menschen langfristig zu erwarten sind.

2.7.4. Schlußfolgerungen

Die Anwendung der 2DE in Kombination mit der Fluorographie, d.h. unter Verwendung radioaktiver Aminosäuren, hat gegenüber der Auftrennung von unmarkierten Proteinen folgende Vorteile:

1) Extrem hohe Auflösung der komplexen Proteinextrakte aus Embryonen.
2) Verbrauch einer geringen Proteinprobenmenge. Das ermöglicht die Untersuchung einzelner Embryonen selbst relativ früher Entwicklungsstadien.
3) Darstellung der Proteinsyntheserate eines bestimmten Entwicklungszeitpunktes anstelle der Wiedergabe der Konzentration der Proteine.

3. Zusammenfassung und Schlußfolgerungen

Der Sinn dieser Arbeit war es, ein in vitro-Testsystem aufzubauen, bei dem einerseits Postimplantationsembryonen der Maus morphologisch und physiologisch unbeschadet kultiviert und andererseits deren Proteine so hoch wie möglich radioaktiv markiert werden können. Es sollten damit radioaktiv markierte Proteine gewonnen werden, die für eine hohe Auftrennung durch zwei-dimensionale Elektrophorese optimal geeignet sind.

Hierzu wurden Inkubations- und Präparationsmethoden für die Altersstufen Tag 10, 11 und 12 der Embryonalentwicklung gefunden. Nach makroskopisch sichtbaren Kriterien (Herzschlag, Durchblutung..., siehe 2.1.1.5.) zeigten unter diesen Bedingungen Tag-10- und Tag-11-Embryonen eine einwandfreie Lebensfähigkeit an; Tag-12-Embryonen hingegen waren unter den gleichen Bedingungen in ihrer Lebensfähigkeit deutlich eingeschränkt (Kapitel 2.1.).

Bei Verwendung von ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium wurde festgestellt, daß Embryonen ohne Eihüllen, sogenannte N-Embryonen (Nackte Embryonen), immer mehr Radioaktivität in ihre Proteine einbauten, als Embryonen mit Eihüllen, den sogenannten DAO-Embryonen (Dottersack und Amnion geöffnet) oder den DO-Embryonen (nur Dottersack geöffnet). Dagegen zeigten die Embryonen mit intaktem Blutkreislauf (DO-Embryonen) eine gleichmäßige Verteilung der radioaktiven Markierung im Körper an. Die Aufnahme der Radioaktivität durch Diffusion spielte bei DO-Embryonen offenbar keine Rolle. Bei N-Embryonen dagegen war mit zunehmendem Alter eine fortschreitende ungleichmäßige Verteilung der Radioaktivität im Körper zu

beobachten, indem innere Gewebe und Organe wesentlich weniger Radioaktivität inkorporierten als die peripheren Körperbereiche. Das galt allerdings nur für N-Embryonen, die älter als Tag 10 waren. Da eine gleichmäßige Verteilung der Markierung im Embryo eine notwendige Voraussetzung für eine representative Darstellung der Proteine durch 2DE ist, wurde die DO-Präparation als die geeignetste Methode angesehen. Tag-10-Embryonen zeigten gegenüber Tag-11- und Tag-12-Embryonen immer den höchsten Einbau an Radioaktivität, gleichgültig nach welcher Methode sie präpariert wurden (Kapitel 2.2.).

Um den Einbau an Radioaktivität in die Proteine von DO-Embryonen zu erhöhen, konnten entweder die Konzentration des verwendeten Isotops oder bzw. die Inkubationsdauer erhöht werden. Am besten bewährte sich dabei eine Kombination von beiden Möglichkeiten. Diese optimalen Bedingungen, die sowohl einen hohen Einbau an Radioaktivität als auch ein morphologisch/physiologisch einwandfreies Überleben in vitro gewährleisteten, waren für Tag-10-DO-Embryonen: 8 Stunden Inkubationsdauer mit 150 µCi/≙ 150 µl ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium unter in vitro-Standardbedingungen; und für Tag-11-DO-Embryonen: 6 Stunden Inkubationsdauer mit ebenfalls 150 µCi/≙ 150 µl ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium unter den ermittelten in vitro-Standardbedingungen (Kapitel 2.3.).

Eine ^{14}C-markierte Aminosäuremischung (vergleichbarer Zusammensetzung und Konzentration der einzelnen Aminosäuren wie bei ^{3}H-markierten Aminosäuren) von 20 µCi/≙ 20 µl statt der sonstigen 150 µCi ^{3}H-markierten Aminosäuren im Kulturmedium erwies sich als gleichwertig verwendbar (Kapitel 2.6.).

Der biologische Zustand der kultivierten Mäuseembryonen wurde zunächst nach makroskopisch sichtbaren Kriterien beurteilt. Darüber hinaus wurden jedoch noch andere Parameter untersucht: Chromosomen, Histologie und zwei-dimensionale Proteinmuster der Tag-10-DO-Embryonen. Nennenswerte Veränderungen, die auf eine schädigende Wirkung der verwendeten Radioaktivität oder der in vitro-Kultivierung hingewiesen hätten, wurden nicht festgestellt (Kapitel 2. 4. und 2.5.).

Die erarbeiteten methodischen Bedingungen für eine weitgehend physiologische Kultivierung von Mäuseembryonen (Tag 10, 11) unter gleichzeitig möglichst hoher Markierung der Proteine mit radioaktiven Aminosäuren wurden für die Darstellung der Embryoproteine durch zwei-dimensionale Elektrophorese und Fluorographie verwendet. Das Gesamtprotein (soweit durch Wasser, Harnstoff und Mercaptoäthanol extrahierbar) eines einzelnen Mäuseembryos am Tag 10 seiner Entwicklung konnte in 3 431 bzw. bei größtmöglicher Gelgröße der 2. Dimension in 5 482 Proteinspots aufgetrennt werden (Kapitel 2.7.).

4. Literaturverzeichnis

AGNISH, N.D., KOCHAR, D.M.: Direct exposure of post-implantation mouse embryos to 5-bromodeoxyuridine in vitro and its effect on subsequent chondrogenesis in the limbs. - J. Embryol. Exp. Morphol. 36, 623 - 638 (1976)

BERRY, C.L.: Comparison of in vivo and in vitro growth of the rat foetus. - Nature, London 219, 92 - 93 (1968)

BONNER, W.M., LASKEY, R.A.: A film detection method for tritium - labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. - Eur. J. Biochem. 46, 83 - 88 (1974)

CHAMBERLAIN, P.J.: Fluorographic detection of radioactivity in polyacrylamide gels with the water-soluble fluor, sodium salicylate. - Anatlytical Biochem. 98, 132 - 135 (1979)

CLARKSON, S.G., DOERING, J.V., RUNNER, M.N.: Growth of post-implantation mouse embryos cultured in serum-supplemented, chemically defined medium. - Teratology 2, 181 - 186 (1969)

COCKROFT, D.L.: Development in culture of rat foetuses explanted at 12.5 and 13.5 days of gestation. - J. Embryol. Exp. Morphol. 29, 473 - 483 (1973)

COCKROFT, D.L.: Growth of rat fetuses in culture. - Pd. D. Thesis University of Cambridge (1974)

COCKROFT, D.L.: Comparison of in vitro and in vivo development of rat fetuses. - Develop. Biol. 48, 163 - 172 (1976)

COCKROFT, D.L., NEW, D.A.T.: Effects of hyperthermia on rat embryos in culture. - Nature 258, No. 5536, pp 604 - 606 December 18 (1975)

CULLEN, B.R., EMIGHOLZ, K., MONAHAN, J.J.: Protein patterns of early mouse embryos during development. - Differentiation 17, 151 - 160 (1980)

DEUCHAR, E.M.: Regeneration of amputated limb-buds in early rat embryos. - J. Embryol. Exp. Morphol. 35, 345 - 354 (1976)

EIBS, H.-G., SPIELMANN, H., HÄGELE, M., KLOSE, J.: Effects of steroid sex hormones on the development of early mouse embryos in vitro and in vivo. - Advances in the Study of Birth Defects Vol. 2, pp 113 - 137. Teratological Testing (ed. T.V.N. Persaud), MTP Press Limited. (1979)

FREEMAN, S.J., BECK, F., LLOYD, J.B.: The role of the visceral yolk sac in mediating protein utilization by rat embryos cultured in vitro. - J. Embryol. Exp. Morphol. 66, 223 - 234 (1981)

GOEDBLOED, J.F.: The embryonic and postnatal growth of rat and mouse. I. The embryonic and early postnatal growth of the whole embryo. A model with exponential growth and sudden changes in the growth rate. - Acta Anat. 82, 305 - 336 (1972)

GOEDBLOED, J.F.: Embryonic and postnatal growth of rat and mouse. IV. Prenatal growth of organs and tissues: age determination, and general growth pattern. - Acta Anat. 95, 8 - 33 (1976)

GOEDBLOED, J.F.: Embryonic and postnatal growth of rat and mouse. V. Prenatal growth of organs and tissues, general principles: allometric growth, absence of growth, and the genetic regulation of the growth process. - Acta Anat. 98, 162 - 182 (1977)

HERNANDEZ-VERDUN, D., LEGRAND, C.: In vitro study of chorionic and ectoplacental trophoblast differentiation in the mouse. - J. Embryol. Exp. Morphol. 34, 3, pp 633 - 644 (1975)

HORNER, D., McLAREN, A.: The effect of low concentrations of (^{3}H) thymidine on pre- and postimplantation mouse embryos. - Biol. Reprod. 11, 553 - 557 (1974)

JOHNSON, M.H., ROSSANT, J.: Molecular studies on cells of the trophectodermal lineage of the postimplantation mouse embryo. - J. Embryol. Exp. Morphol. 61, 103 - 116 (1981)

KLOSE, J.: Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissue. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. - Humangenetik 26, 231 - 243 (1975a)

KLOSE, J.: Protein mapping as a tool for investigating and teratogenic effects in mouse embryos. In: New approaches to the evaluation of abnormal embryonic development (D. Neubert, H.-J. Merker, Eds.), pp 375 - 387, Stuttgart, Thieme Verlag (1975 b)

KLOSE, J.: Isoelectric focusing and elektrophoresis combined as a method for defining new point mutations in the mouse. Genetics 92, 13 - 24 supplement (1979): Proceedings of the workshop: Methods in mammalian mutagenesis, Bar Harbor (Maine) (1976)

KLOSE, J.: High resolution of complex protein solutions by two-dimensional electrophoresis. In: Modern Methods in Protein Chemistry, Ed. H. Tschesche. - Walter de Gruyter, Berlin, New York, in press (1983)

KLOSE, J., FELLER, M.: Two-dimensional electrophoresis of membrane and cytosol proteins of mouse liver and brain. - Electrophoresis 2, 12 - 24 (1981a)

KLOSE, J., NOWAK, J., KADE, W.: Two-dimensional electrophoresis: high resolution of proteins and automatic evaluation of the patterns under different methodical conditions. In: Radola BJ (ed) Electrophoresis '79, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp 297 - 312 (1980)

KOCHAR, D.M.: The use of in vitro procedures in teratology. - Teratology 11, 274 - 287 (1975)

KOCHAR, D.M., HOFFMAN, D.B.: Growth and biosynthesis of cell components in mouse embryos cultured in rotating tubes. - Teratology 9, A 25 - 26 (Abstr.) (1974)

LASKEY, R.A., MILLS, A.D.: Quantitative fim detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. - Eur. J. Biochem. 56, 335 - 341 (1975)

LOWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with folin phenol reagent. - J. Biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MACQUEN, H.A.: Lethality of radioisotopes in early mouse embryos. - J. Embryol. Exp. Morphol. 52, 203 - 208 (1979)

MOORE, A.T., WILLIAMS, K.E., LLOYD, J.B.: The effect of chemical treatments of albumin and orosomucoid on rate of clearance from the rat bloodstream and rate of pinocytic capture by rat yolk sac cultured in vitro. - Biochem. J. 164, 607 - 616 (1977)

NEW, D.A.T.: The culture of vertebrate embryos. - London: Logos Press (1966a)

NEW, D.A.T.: Methods for the culture of post-implantation embryos of rodents. In: Methods in Mammalian Embryology, ed. J.C. Daniel, pp 305 - 319, San Francisco: Freeman (1971)

NEW, D.A.T.: Studies on mammalian fetuses in vitro during the period of organogenesis. In: The Mammalian Fetus in Vitro (ed. C.R. Austin), pp 15 - 65, Chapman and Hall, London (1973)

NEW, D.A.T.: Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. - Biol. Rev. 53, 81 - 122 (1978)

NEW, D.A.T.,COCKROFT, D.L.: A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase. - Experientia 35, 138 - 140 (1979)

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T.: Effect of different oxygen concentrations on the development of rat embryos in culture. - J. Reprod. Fert. 21, 109 - 118 (1970a)

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T.: Development of explanted rat fetuses in hyperbaric oxygen. - Teratology 3, 153 - 162 (1970b)

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T., COCKROFT, D.L.: Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embryos. - J. Embryol. Exp. Morphol. 36, 133 - 144 (1976b)

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T.: Development of a placental blood circulation in rat embryos in vitro. - J. Embryol. Exp. Morphol. 37, 227 - 235 (1977)

NEW, D.A.T., COPPOLA, P.T., TERRY, S.: Culture of explanted rat embryos in rotating tubes. - J. Reprod. Fert. 35, 135 - 138 (1973)

NEW, D.A.T., STEIN, K.F.: Cultivation of postimplantation mouse and rat embryos on plasma clots. - J. Embryol. Exp. Morphol. 12, 101 - 111 (1964)

NOWAK, J., KLOSE, J.: Mutagenitätstestung an Mäusen durch Proteinmapping. - In Vorbereitung (1984)

PAUL, J.: Cell and tissue culture. - 4th ed. Livingstone, London (1970)

PAYNE, G.S., DEUCHAR, E.M.: An in vitro study of functions of embryonic membranes in the rat. - J. Embryol. Exp. Morphol. Vol. 27, 3 , 533 - 542 (1972)

RAHMSDORF, H.-J., PONTA, H., BÄCHLE, M., MALLICK, U., WEIBEZAHN, K.-F., HERRLICH, P.: Differentiated cells from Balb/c mice differ in their radiosensitivity. - Exp. Cell Res. 136, 111 - 117 (1981)

ROBKIN, M.A., SHEPARD, T.H., TANIMURA, T.: A new in vitro culture technique for rat embryos.- Teratology 5, 367 - 376 (1972)

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. - R. Oldenbourg-Verlag, München - Wien (1968)

SADLER, T.W.: Culture of eraly somite mouse embryos during organogenesis. - J. Embryol. Exp. Morphol. 49, 17 - 25 (1979)

SADLER, T.W., KOCHAR, D.M.: Biosynthesis of DNA, RNA and proteins by mouse embryos cultured in the presence of a teratogenic dose of chlorambucil. - J. Embryol. Exp. Morphol. 36, 273 - 281 (1976)

SADLER, T.W., NEW, D.A.T.: Culture of mouse embryos during neurulation. - J. Embryol. Exp. Morphol. 66, 109 - 116 (1981)

SNOW, M.H.L.: Abnormal development of pre-implantation mouse embryos grown in vitro with (^{3}H)thymidine. - J. Embryol. Exp. Morphol. 29, 601 - 615 (1973)

STEELE, C.E.: The culture of post-implantation mammalian embryos. In: The Early Development of Mammals (ed. M. Balls and A.E. Wild), pp 61 - 79, Cambridge University Press (1975)

TÄGDER, K., SCHEUERMANN, W. Estimation of absorbed doses in the cell nucleus after incorporation of ^{3}H and ^{14}C-labelled thymidine. - Rad. Res. 41, 202 - 216 (1970)

TAM, P.P.L., SNOW, M.H.L.: The in vitro culture of primitive-streak-stage mouse embryos. - J. Embryol. Exp. Morphol. 59, 131 - 143 (1980)

TAMARIN, A., JONES, K.W.: A circulating medium system permitting manipulation during culture of postimplantation embryos. - Acta Embryologiae et Morphologiae Experimentalis 10, 288 - 301 (1968)

TANIMURA, T., SHEPARD, T.H.: Glucose metabolism by rat embryos in vitro. - Proceedings of the Society for Exp. Biol. and Medicin 135, 51 - 53 (1970)

THEILER, K.: The house mouse. Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age. - Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York (1972)

WILLIAMS, K.E., KIDSTON, M.E., BECK, F., LLOYD, J.B.: Quantitative studies of pinocytosis. II. Kinetics of protein uptake and digestion by rat yolk sac cultured in vitro. - J. Cell Biol. 64, 123 - 132 (1975b)

WROBLEWSKA, J., DYBAN, A.P.: Chromosome preparations from mouse embryos during early organogenesis: dissociation after fixation followed by air-drying. - Stain Techn. 44, 147 - 169 (1969)

ZEINDL, E., SPERLING, K.: Chromosomal analysis of embryonic tissues. In: Methode in Prenatal Toxicology, eds. Neubert, D. and Merker, H.-J., pp. 290 - 302, Thieme Verlag, Stuttgart (1977)

ZEINDL, E., KLOSE, J.: Effect of radioactive amino acids on the chromosomes, viability and two-dimensional protein patterns of cultured mammalian cells. - In Press (1984)

5. Anerkennung

Für die Überlassung des Themas und die vielen fruchtbaren Ratschläge sowie dem immer regen Interesse und Bemühen am Fortgang dieser Arbeit möchte ich mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. Dr. J. Klose, sehr herzlich bedanken.

Darüber hinaus gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern des Instituts für Toxikologie und Embryonalpharmakologie der Freien Universität Berlin, insbesondere den Herren aus der Feinmechanikerwerkstatt, allen Tierpflegern, der Fotografin, den Spülfrauen sowie unserem Hausmeister, die alle auf ihre Art für ein erfolgreiches Zustandekommen der vorliegenden Arbeit sorgten.

Für die technische Unterstützung und die überaus gute Arbeitsatmosphäre möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Kolleginnen der Arbeitsgruppe "Genetik" ebenfalls recht herzlich bedanken.

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 29: Embryonale Entwicklung und Differenzierung) finanziell unterstützt.

6. Lebenslauf

Name:	Jean Nowak
Geburtsdatum:	4. Mai 1950
Geburtsort:	Berlin
Vater:	Isu Mohnblatt, Textilkaufmann
Mutter:	Jerica Nowak, Sekretärin
Schulabschlüsse:	
1967	Zeugnis der Mittleren Reife, erhalten von der Otto von Guericke-Schule (Realschule)
21. 1. 1971	Zeugnis der Allgemeinen Hochschulreife, bestanden an der Sophie-Charlotte-Oberschule (Aufbaustufe CS 2)
Studiengang:	
23. April 1971	Beginn des Studiums im Fachbereich 23 (Biologie) der Freien Universität Berlin
12. Juli 1973	Vordiplom
21. Mai 1976	Diplom in Allgemeiner Biologie und Genetik
Arbeitsbeginn:	
1. Juni 1976	Wissenschaftlicher Teilzeitassistent im Sonderforschungsbereich 29, Embryonalpharmakologie im Projekt C-3 von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Klose
1. Oktober 1978	Wissenschaftlicher Assistent im Institut für Toxikologie und Embryonalpharmakologie im o.g. Projekt